C.S.A.T

Ano 1944
Tomo 41
Fascículo 1

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

1944
IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO – BRASIL

ÍNDICE

Tomo 41 Agôsto, 1944 Fascículo 1

COUTINHO, J. O., RACHOU, RENÉ, e FERREIRA, MÁRIO — Considerações em tôrno de uma inspeção preliminar de malária em zona de alta endemicidade no Estado de Santa Catarina 1-19

UBATUBA, F., e VIEIRA GESSY — Estudos sôbre a bartonelose. I. A bartonelose dos ratos esplenectomizados e a Penicilina 21-44

FURTADO, ADOLPHO DA ROCHA — Atividade antibacteriana do *Aspergillus flavus* 45-58

MAGALHÃES, OCTAVIO, e ROCHA, ADYR — Tifo exantemático neotrópico no Brasil. Ensaios terapêuticos com a Penicilina 59-64

MAGALHÃES, OCTAVIO, e ROCHA, ADYR — Contribuição ao estudo das Pasteurellas. Pasteurella intermédia, n. sp. 65-94

SALLES, JONIO F., e HATHAWAY, CHARLES — Nota sôbre a infestação de *Musca domestica*, Linneu, 1758, por um Ficomiceto do gênero *Empusa* 95-100

LACORTE, J. GUILHERME, e SANTOS, MÁRIO — Endocardites sépticas.... 101-162

GUDIN, MAURICIO, e NEIVA FILHO, ALOYSIO — Tratamento da Osteomielite por assepsia integral e Penicilina intra-arterial. Sutura primitiva e secundária da ferida... 163-166

CRUZ, W. O., PIMENTA DE MELLO, R. e SILVA, E. M. DA — Estudos sôbre a anemia produzida em cães por benzoato de estradiol 167-178

DA CUNHA, ARISTIDES MARQUES, e MUNIZ, JÚLIO — Pesquisas sôbre o *Endotrypanum schaudinni* Mesnil e Brimont, 1908, parasita do *Choloepus didactylus* (L.) 179-194

MIRANDA, RUY NORONHA — Resultados comparativos das reações intradérmicas com antígenos de bacilos ácido-álcool-resistentes (Leprolinas "Souza-Araujo") e emulsão de lepromas (Lepromina) 195-200

SOUZA-ARAUJO, H. C. DE — Verificação da infecção de môscas da família *Tachinidae* pela *Empusa Cohn*, 1855. Essas môscas, sugando úlceras leprósticas, se infestaram com o bacilo de Hansen 201-203

As **MEMÓRIAS**, órgão oficial do Instituto Oswaldo Cruz, editadas sob a direção do Dr. H. C. de Souza-Araujo, são reservadas, exclusivamente, à publicação de trabalhos nêle realizados, e aparecerão em fascículos bimensais ou trimensais.

Tôda a correspondência deverá ser dirigida à:

REDAÇÃO DAS MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
CAIXA POSTAL 926 — ENDERÊÇO TELEGRÁFICO: "MANGUINHOS", RIO
RIO DE JANEIRO — BRASIL

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 41 Agosto, 1944 Fascículo 1

Considerações em tôrno de uma inspecção preliminar de malária em zona de alta endemicidade no Estado de Santa Catarina (*)

por

J. O. Coutinho, Renê Rachou e Mario Ferreira

(Com um esquêma no texto)

Em outubro de 1943, realizámos uma inspeção preliminar de Malária, em Caldas da Imperatriz, estação hidro-mineral localizada no Município de Palhoça, no Estado de S. Catarina. No decorrer dessa inspeção colhemos dados de grande valor prático para o estudo da malária no Brasil, tanto sôbre o tipo endêmico da doença como em relação aos vectores, dando, dessa fórma, um novo aspecto ao problema de profilaxia da doença no Sul do País. Resolvemos publicá-los com o fim de darmos conhecimento aos estudiosos no assunto.

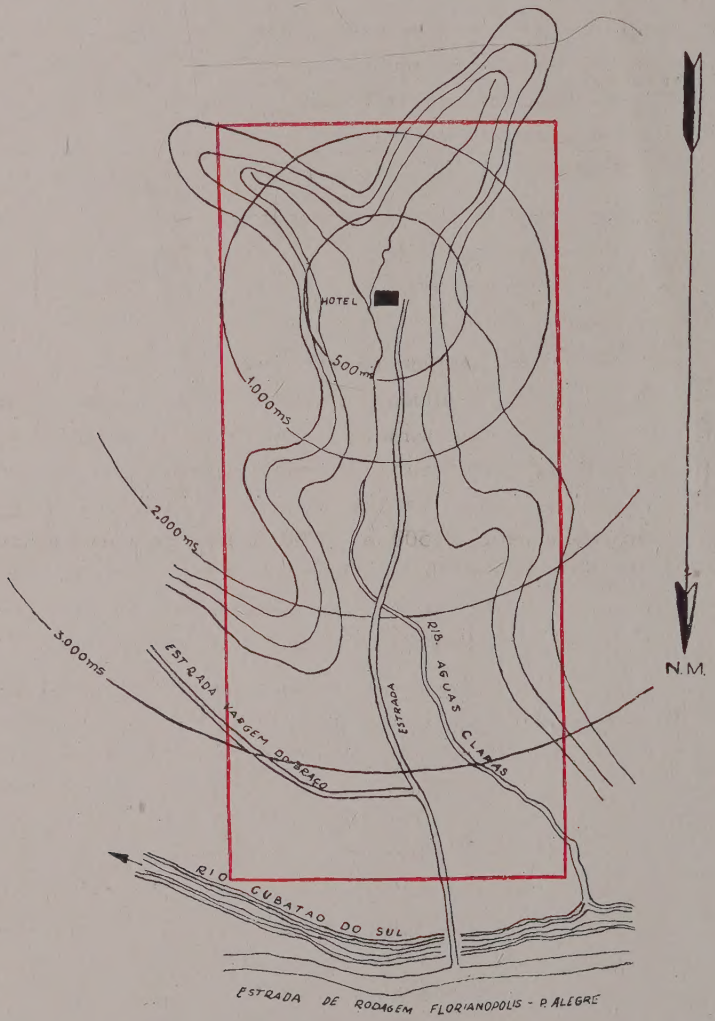
A matéria que constitui assunto para essa nota acha-se separada em quatro partes:

1) Ligeiro histórico de Caldas da Imperatriz.
2) Estudo sumário da epidemiologia local da malária.
3) Investigações sôbre as espécies vectoras locais.
4) Comentários em tôrno das observações colhidas.

* Recebido para publicação a 19 de junho e dado à publicidade em agôsto de 1944.

CALDAS DA IMPERATRIZ

"CROQUIS" DA ÁREA ONDE FORAM FEITAS PESQUISAS ENTOMÓLOGICAS



ESCALA 1:30.000

1) Denominam-se Caldas da Imperatriz certas fontes hidro-minerais, em número de quatro, situadas no distrito de Santo Amaro, município de Palhoça, Estado de Santa Catarina.

As águas dessas fontes acham-se devidamente captadas, aí existindo um estabelecimento balneário, onde ainda estão em uso seis banheiras de mármore de Carrara, oferecidas, em 1846, pela Imperatriz do Brasil, um estabelecimento para o engarrafamento das águas, no momento paralisado, e um hotel com trinta e cinco quartos, diretamente ligado ao balneário.

Caldas da Imperatriz resume-se, ùnicamente, nesse hotel, cuja frequência, embora ainda grande, nos meses de inverno, vem caindo, de ano para ano, tal a certeza que tem o povo de contrair a malária, se passarem alguns dias nessa estância balneária.

Encontra-se o hotel a uma altitude de 200 metros, à margem esquerda do Ribeirão Águas Claras, que é afluente do Rio Cubatão do Sul. O Ribeirão Águas Claras é todo encachoeirado, de leito rochoso, apresentando, de distâncias em distâncias, verdadeiras pequenas represas; sua nascente acha-se ao sul do hotel, não muito distante dêste, e seu vale, relativamente estreito, mede, aproximadamente, 3.500 a 4.000 metros de comprimento. Distante cêrca de 3.300 metros da foz do Ribeirão, acha-se o hotel, que é cercado por morros ao sul, a leste e a oeste, suficientemente altos para constituirem obstáculos ao vôo de mosquitos, e recoberto por densa vegetação.

Uma pequena estrada de rodagem, em péssimo estado de conservação, liga o hotel à Estrada de rodagem Florianópolis-Pôrto Alegre, margeando, em todo o seu percurso, o Ribeirão Águas Claras, a princípio por sua margem esquerda e, depois, por sua margem direita. Ao longo dessa estrada, de ambos os lados da mesma, existe cêrca de meia centena de casas, relativamente distanciadas umas das outras, estando, no momento, oito deshabitadas.

A uma distância aproximada de 3.000 metros do hotel, sai uma outra estrada, esta carroçável, a estrada da Vargem do Braço, que percorre um vale vizinho e pararelo ao do Ribeirão Águas Claras.

A zona que constituiu a nossa área de trabalho, termina, justamente, no ponto de encontro dessa estrada com a que vai ter ao hotel, abrangendo todo o vale do Ribeirão Águas Claras, conforme se pode ver pelo "croquis" em anexo, onde a área pesquisada está enquadrada em um retângulo de côr vermelha.

2) DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Antecedentes maláricos. Das 256 pessoas recenceadas (total da população fixa) 252 acusaram passando malárico, o que corresponde a 98,4% da população. Dessas 252 pessoas, 170 (67,4%) tiveram, segundo suas informações, sua primo-infecção no local e as 82 restantes (32,6%) noutras zonas do próprio município de Palhoça. Os 170 casos de primo-infecção autóctone são assim escalonados:

antes de 1911 — 9 casos
de 1911 a 1920 — 12 "
de 1921 a 1930 — 24 "
de 1931 a 1940 — 90 "
de 1941 a 1943 — 33 "

Os dois casos restantes não puderam ser enquadrados por falta de dados.

Incluindo-se 12 casos de primo-infecção autóctone ocorridos em 1943, tiveram malária (reinfecções e recaidas) durante êsse ano 195 pessoas ou sejam 76,2% do total da população.

Parasitemia. Examinámos 256 amostras de sangue; isto equivale a dizer que examinámos 100% da população fixa. Encontrámos 34 lâminas positivas, o que nos dá um *índice parasitário de* 13,3%; dessas 34 lâminas positivas, em 25 constatámos a presença de gametocitos, dando-nos um percentual de gametóforos de 73,6 % sôbre o total de lâminas positivas e do 9,8% em relação ao total de recenseados e examinados.

Três espécies de plasmódios compareceram, *Pl. vivax, Pl. malariae* e *Pl. falciparum,* nas seguintes percentagens: 38,23%, 44,11% e 11,76%. Os 5,88% restantes são representados por duas lâminas em que o *vivax* e o *falciparum* apresentaram-se associados. Como vemos pelos percentuais acima, houve predominância do *Pl. malaria* que concorreu com 15 lâminas das 34 positivas.

Se dividirmos os recenseados em dois grupos, menores de 15 (15 anos), teremos como índices parasitários :

para o 1.º grupo, 22,7%
para o 2.º grupo, 5,5%

o que nos mostra ser a parasitemia bem mais freqüente entre as crianças que entre adultos. Mostram êsses dados que a transmissão da doença seja domiciliar, as idades mais baixas as mais atingidas.

ESPECIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES PARASITÁRIAS DISTRIBUÍDAS POR GRUPOS ETÁRIOS

INDICAÇÕES	GRUPOS ETÁRIOA (ANOS							TOTAIS	%
	0-1	1-4	5-9	10-14	15-19	20-49	50 e +		
N.º de pessoas examinadas	4	24	43	39	34	93	19	256	—
N.º de lâminas positivas	1	12	7	4	4	4	2	34	13,3%
N.º de lâminas c/gametocitos	1	7	7	2	2	4	2	25	73, 6%
N.º de lâminas c/*Pl. malariae*	—	2	4	2	2	3	2	15	44,11%
N.º de lâminas c/*Pl. vivax*	—	5	2	2	2	1	—	13	38,23%
N.º de lâminas c/*Pl. falciparm*	—	3	1	—	—	—	—	4	11,76%
N.º de lâminas c/plasmódios associados	—	2	—	—	—	—	—	2	5,88%

BAÇO	GRUPOS ETÁRIOS							TOTAIS	%
	Até 1	1-4	5-9	10-14	15-19	29-49	50 e+		
0	1	4	9	11	13	33	8	79	34,20%
1	2	16	25	16	13	28	6	106	45,88%
2		3	5	6	2	10	3	29	12,55%
3		1	2	3	2	5		13	5,63%
4				1		3		4	1,74%
TOTAIS.....	3	24	41	37	30	79	71	231	100,00%
Indice esplênico.....	66,66%	85,56%	78,05%	70,27%	56,66%	58,23%	52,94%	65,80%	

Índice esplênico 65,80%

Baço médio 1,2

Baço médio aumentado 1,4

ÍNDICE ENDÊMICO DE ROSS

	GRUPOS ETÁRIOS				TOTAIS	
	ATÉ 15 ANOS		MAIS DE 15 ANOS			
	N.º DE PESSOAS	%	N.º DE PESSOAS	%	N.º DE PESSOAS	%
Com samgue negativo e sem esplenomegalia...	25	25%	54	41,86%	79	34,49%
Com sangue negativo e com esplenomegalia...	54	54%	62	48,06%	116	50,64%
Com sangue positivo e sem esplenomegalia....	2	2%	4	3,10%	6	2,66%
Com sangue positivo e com esplenomegalia....	19	19%	9	6,98%	28	12,21%
TOTAIS.....	100		129		229	100,00%

ÍNDICE ENDÊMICO DE ROSS

ATÉ 15 ANOS	MAIS DE 15 ANOS	GERAL
75%	58,14%	65,51%

Esplenomegalia. Adotando o método de palpação do baço em posição ortostática, o único compatível com os trabalhos de campo, avaliamos o volúme do baço de 231 pessoas, das 256 recenseadas. Temos, pois, 90,23% de pessoas com baço examinado do total de moradores na localidade.

Das 231 pessoas examinadas, foi constatada a presença de esplenomegalia em 152, o que equivale a um *índice* esplênico de 65,80%. Foi a seguinte a distribuição das esplenomegalias constatadas por grupos etários e de acôrdo com a escala de BOYD:

3) INVESTIGAÇÕES ENTOMOLÓGICAS

1. Pesquisas larvárias:

   a) terrestres;
   b) em Bromeliáceas.

2. Capturas de alados:

   a) capturas intra-domiciliares;
   b) capturas com isca humana;
   c) capturas com isca animal;
   d) capturas em abrigos de animais.

3. Dissecações.
4. Conclusões.

ESTUDO DA FAUNA ANOFÉLICA

a) terrestres;
b) em Bromeliáceas.

Pesquisas larvárias terrestres. Foram pesquisadas tôdas as coleções e cursos d'água existentes, desde a nascente do Ribeirão Águas Claras, até a confluência das estradas da Vargem do Braço e do Hotel. Como já dissemos linhas atrás, o Ribeirão Águas Claras é todo encachoeirado e de leito rochoso, com vários pontos onde suas águas ficam, parcialmente, represadas, formando pequenos lagos ou reprêsas. Recebe o Ribeirão, por ambas as margens, numerosos pequenos cursos d'água, que podem ser classificados como valas.

As águas das fontes de Caldas da Imperatriz foram classificadas como "oligometálicas hipertérmicas radioativas", sua temperatura é de 40° C. Todo o excesso dessas águas, desprezado pelos estabelecimentos balneário e de en-

garrafamento, se escoa para o Ribeirão, cujas águas, nas proximidades das fontes, são de temperatura relativamente elevada. Tomamos a temperatura da água nos 35 focos larvários terrestres que localizamos, temperatura essa que oscilou entre 16 e 24° C da seguinte maneira:

16° C	3 focos
17° C	8 focos
18° C	1 foco
19° C	5 focos
20° C	16 focos
21° C	—
22° C	—
23° C	—
24° C	2 focos

Os dois focos de temperatura de 24° C. são coleções de águas represadas por grandes pedras, nas proximidades das fontes termais que os alimentam. Aí colhemos larvas de *A.* (*N*) *strodei*, *A.* (*M*) *antunesi* e *A.* (*Arribalzagia*) Sp.

Foram os seguintes os tipos de focos encontrados:

Vala	27
Águas represadas	2
Poço de terra	2
Depressões naturais	2
Poço revestido	1
Pegadas de animais	1
	35

As larvas colhidas foram assim identificadas:

A. (*N*) *strodei*	79	(43,89%)
A. (*M*) *antunesi*	41	(22,78%)
A. (*Arribalzagia*) Sp	30	(16,67%)
A. (*M*) *lutzi*	18	(10,00%)
Chagasia fajardoi	7	(3,89%)
A. (*N*) *argyritarsis*	3	(1,67%)
A. (*Nyssorhynchus*) Sp	2	(1,11%)
	180	

Pesquisas larvárias em Bromeliáceas. Tendo em vista o conceito formulado por Adolfo Lutz e reforçado por outros pesquesadores de que os "gravatás" mais altamente situados são os melhores criadouros dos anofelíneos pertencentes ao sub-gênero *Kerteszia,* fizemos nossas pesquisas em *Bromeliáceas,* considerando três grupos dessas plantas, conforme a altura em que estavam situadas. Assim, pesquisámos "gravatás" localizados sôbre pedras e sôbre árvores a menos de dois metros de altura do chão, entre dois e cinco metros e a mais de cinco metros. Obtivemos os seguintes resultados:

1.º grupo: "gravatás" sôbre pedras e sôbre árvores a menos de dois metros de alturà do chão — pesquisámos 2.337 "gravatás", nos quais, colhemos 172 larvas de *Kerteszia,* sendo 163 diagnosticadas como *A. (K) cruzii* e nove como *A. (Kerteszia)* Sp.

2.º grupo: "gravatás" sôbre árvores entre dois e cinco metros de altura do chão — pesquisámos 52 "gravatás", neles colhendo 26 larvas de *A. (K) cruzii.*

3.º grupo: "gravatás" sôbre árvores a mais de cinco metros de altura do chão — pesquisámos 491 "gravátas", nos quais colhemos 101 larvas de *A. (K) cruzii.*

O estabelecimento do índice larvário dêsses criadouros aéreos, tirando-se o percentual de "gravatás" com larvas sôbre o número de "gravatás" pesquisados, nos daria uma idéia mais precisa quanto à distribuição dos mesmos e à densidade larvária. Sua obtenção requereria, no entanto, pesquisas muito demoradas e lentas, pois exigiria que se examinasse, cuidadosamente, gravatá por gravatá retirado, cuja água, neles contida, teria que ser despejada em recipientes separados, um para cada gravatá. Acrescente-se, ainda, a dificuldade que se apresenta para colher as larvas de *Kerteszia* nesses recipientes, já que as mesmas submergem por longo espaço de tempo, só vindo à superfície de quanto em quando e muito espaçadamente; a água colecionada no interior de gravatás apresenta-se, sempre, muito escura, pelo depósito aí existente, de fôlhas, terra, detritos outros, etc., constituindo-se, pois, um outro obstáculo para a colheita rápida das larvas. Uma pesquisa de larvas em gravatás, quando feita sem muito cuidado e atenção, pode dar resultados falsos. É preciso, pois, que a mesma seja feita demoradamente, e que as águas recolhidas dos gravatás sejam repetidamente examinadas. Dessa maneira, pequeno, muito pequeno mesmo, teria que ser o número de gravatás pesquisados se fôssemos pesquisar gravatás por gravatás. E, para que êsse número seja maior e, conseqüentemente, tenhamos dados mais expressivos, relativos às larvas de *Kerteszia,* fazemos nossas pesquisas em grupos de gravatás: as águas dêles recolhidas são recebidas em um mesmo recipiente, anotando-se o

número de gravatás pesquisados. Naturalmente, tais pesquisas não nos permitem estudar os focos preferenciais de tais anofelíneos, dentre as mais de 300 variedades existentes de "gravatás", estudos êsses que só podem ser feitos paulatinamente, quando estivermos mais desafogados de serviço.

Assim, para o estudo comparativo dos três grupos de gravatás que pesquisámos em Caldas da Imperatriz, resolvemos tirar, não o índice larvário, mas uma média de larvas por gravatá.

Foi o seguinte o resultado:

1.º grupo	0,07
2.º grupo	0,50
3.º grupo	0,21

pelo qual teriamos que concluir que os gravatás situados entre dois e cinco metros de altura do chão, seriam os criadouros mais ricos na região. Deixamos, no entanto, de fazer tal conclusão, tendo em vista o número, por demais pequeno, dêsses gravatás pesquisados, em comparação com o do 1.º grupo (52 para 2.337).

Em Caldas da Imperatriz, é grande o número de gravatás situados sôbre pedras. Pesquisas larvárias, neles realizadas, deram resultado positivo para larvas de *Kerteszia*.

Em resumo:

N.º de gravatás pesquisados	2.880
N.º de larvas colhidas	299

sendo:

A. (*K*) *cruzii*	290
A. (*Kerteszia*) Sp	9
	299

PESQUISAS LARVÁRIAS EM BROMELIÁCEAS:

N.º DO GRUPO	ALTURA DO CHÃO	N.º DE GRAVATÁS PESQUISADOS	N.º DE LARVAS COLHIDAS	MÉDIA POR GRAVATÁ
1.º	Até 2 metros	2.337	172	0,07
2.º	Entre 2 e 5 metros	52	26	0,50
3.º	A mais de 5 metros	491	101	0,21

QUADRO N.° 1

RELAÇÃO DOS TIPOS DE FOCOS LARVÁRIOS TERRESTRES E TEMPERATURA DE SUAS ÁGUAS E DAS ESPÉCIES DE ANOFELINEOS AÍ ENCONTRADAS

N. DE ORDEM	TIPOS DO FOCO	TEMPERATURA DA ÁGUA	N.° DE LARVAS COLHIDAS	*A. (N)strodei*	*A. (M)antunesi*	*A. (Arrib.) sp*	*A. (M) lutzi*	*C. fajardoi*	*A. (N)aryrgyrii.*	*A. (Nyssorh) Sp*
1	Vala	16°	1	—	—	—	1	—	—	—
2	Vala	16°	4	1	2	—	—	1	—	—
3	Vala	16°	3	1	—	—	—	—	2	—
4	Vala	17°	2	—	2	—	—	—	—	—
5	Vala	17°	4	—	3	1	—	—	—	—
6	Pegadas de animais	17°	10	—	8	—	1	—	1	—
7	Vala	17°	4	—	2	—	2	—	—	—
8	Vala	17°	2	1	—	1	—	—	—	—
9	Vala	17°	6	—	4	—	2	—	—	—
10	Vala	17°	1	—	—	—	1	—	—	—
11	Vala	17°	5	3	1	—	1	—	—	—
12	Águas represadas	24°	12	11	—	1	—	—	—	
13	Águas represadas	24°	36	35	1	—	—	—	—	
14	Poço revestido	19°	3	—	1	1	—	1	—	—
15	Vala	20°	5	1	—	4	—	—	—	—
16	Depressões naturais	20°	2	1	—	1	—		—	—
17	Vala	20°	12	9	2	—	—	—	—	—
18	Poço de terra	20°	19	—	11	—	8	—	—	—
19	Vala	19°	8	—	1	7	—	—		—
20	Vala	20°	3	2	—	1	—	—	—	—
21	Vala	20°	2	2		—	—	—	—	—
22	Poço de terra	20°	4	4	—	—		—	—	—
23	Vala	20°	2	2	—	—		—	—	
24	Vala	19°	1	1	—	—	—	—	—	
25	Vala	19°	1	1		—	—	—	—	—
26	Depresões naturais	20	4	3	—	1	—	—	—	—
27	Vala	20°	3	—	—	3	—	—	—	—
28	Vala	20°	4	—	—	4	—	—	—	—
29	Vala	20°	5	—	—	5		—	—	—
30	Vala	20°	2	—	—	—	1	1	—	—
31	Vala	20°	2	—	—	—	—	2	—	—
32	Vala	19°	3	—	—	—	—	2	—	1
33	Vala	20°	1	1	—	—	—	—	—	—
34	Vala	20°	3	0	2	—	1	—	—	—
35	Vala	19°	1	—	1	—	—	—	—	—
	TOTAIS		180	79	41	30	18	7	3	1

CAPTURA DE ALADOS

Capturas intradomiciliares. No vale do Ribeirão Águas Claras, área em que foram feitas as pesquisas entomológicas, acham-se localizadas 42 casas, inclusive o Hotel, que recebeu o número 1. Por ocasião do recenseamento malárico, aí realizado concomitantemente, foram numeradas, além dessas, outras casas, situadas ao longo da Estrada Vargem do Braço, mas fora da área onde procedemos essas pesquisas; por êsse motivo, encontram-se, neste relatório, referências a casas com número superior a 42.

Realizámos capturas intradomiciliares em 35 (83,33%) dessas 42 casas. Em 22 das 35 casas visitadas, foram capturados exemplares da tríbo *Ano-*

phelini, o que representa 62,86% do total das casas inspeccionadas. E' bem verdade, porém, que, em quatro delas, só na segunda captura tivemos resultado positivo e em duas, foi preciso uma terceira captura, conforme se pode verificar no quadro n.º 5.

Em 15 casas, realizamos uma única captura e, em 10, encontramos anofelíneos. Em 13, fizemos duas capturas; dessas 13 casas, em quatro, as duas capturas foram positivas; em cinco, ambas foram negativas, e, em quatro, a primeira foi negativa e a segunda, positiva. Em seis, procedemos a três capturas em cada, sendo que em uma delas, as três foram positivas; em duas, só a terceira captura foi positiva, e, em três, tôdas as capturas foram negativas. Finalmente, em uma casa, o hotel, foram feitas 13 capturas, tôdas com resultado positivo. Assim, em um total de 71 inspecções intradomiciliares (35 casas), tivemos 40 positivas (56,34%).

Veja-se o quadro n.º 5.

O número de anofelíneos capturados, no interior dêsses domicílios, foi de 938, tendo sido de 45.57 horas a duração total dessas capturas. Temos, assim, uma média horária geral de 20,41.

Foram realizadas capturas intradomiciliares em quase tôdas as horas do dia. Deixaram de ser feitas, apenas, entre quatro e cinco horas, 12 e 16 horas, e 21 e 22 horas. Em tôdas as horas em que foram feitas pesquisas, capturámos anofelíneos.

Se dividirmos as 24 horas do dia em períodos de quatro horas, teremos os seguintes dados, relativos às capturas intradomiciliares realizadas nesses períodos, com exceção do 4.º período (12-16 horas) quando não foram feitas capturas:

QUADRO A

Períodos do dia	0-4h	4-8h	8-12h	12-16h	16-20h	20-24h
Horas de captura	4.20	13.25	3.10	—	14.40	10.02
N.º c anofelíneos capturados	139	294	79	—	228	198
Média horária	32.10	21.38	24.94	—	15.54	19.05

Para períodos de oito horas, tomando como ponto de partida a hora O, temos o seguinte:

QUADRO B

Períodos do dia 0	0-8	8-16	16-24
Horas de captura	17.45	3.10	24.02
N.º dé anofelíneos capturados	433	79	426
Média horária	24,39	24,94	17,72

Como já dissemos linhas atrás, foram capturados, em domicílio, 938 mosquitos, dos quais, 937 foram identificados como *A. (K) cruzii* e 1 como *A. (K) bellator.*

O hotel de Caldas da Imperatriz (casa n.º 1) mereceu, de nossa parte, tôda a atenção. Aí, realizámos 13 capturas, em várias horas do dia, tôdas positivas, com um total de 730 anofelíneos, *A. (K) cruzii.* Sua duração total foi de 19.15. Tivemos, assim, para o hotel, uma média horária de 36,96, para as capturas intradomiciliares aí realizadas. A entrada dêsses anofelíneos se fazia durante tôdas as horas do dia, mas, principalmente, ao anoitecer, quando invadiam, em grande número, a sala de refeições do Hotel e os quartos, então ocupados por hóspedes. Os quartos que, na ocasião, estavam vagos, e isso a quase totalidade dos quartos do hotel, foram, também, inspecionados; essas capturas foram, porém, sempre, muito pobres. No quarto n.º 6 acham-se assinaladas as capturas realizadas no Hotel.

Temos, pois, em resumo:

Número de capturas realizadas	26	
Número de capturas positivas	26	(100%)
Número de casas inspecionadas	35	
Número de casas com anofelíneos	22	
Número de inspecções realizadas	71	
Número de inspecções positivas	40	
Número de anofelíneos capturados ...	938	
Duração total das capturas	45h57	

Média horária : 20,41

Espécies de anofelíneos capturados :

A. (K) cruzii	204	(98,07%)
A. (Kerteszia) Sp	4	(1,93%)
Total.	208	

Capturas com isca animal: Realizamos sete capturas com isca animal (cavalo), tôdas ao anoitecer, iniciadas entre 17,30 e 18,30. Sua duração total foi de 12,00 horas e 1010 o número de anofelíneos capturados, o que corresponde a uma média horária de 84,17. Nestas capturas, compareceram outros

anofelíneos, que não o *A. (K) cruzii*, muito embora êste tenha concorrido com grande maioria de exemplares capturados.

Resumo:

Número de capturas realizadas	7
Número de capturas positivas	7
Número de anofelíneos capturados	1.010
Duração total das capturas	12 horas

Média horária : 84,17

Espécies de anofelíneos capturados.

A. (K) cruzii	953	(94,34%)
A. (M) antunesi	18	(1,77%)
A. (Kerteszia) Sp	16	(1,57%)
A. (N) strodei	12	(1,18%)
A. (Arribalzagia) Sp	5	(0,48%)
A. (M) lutzi	3	(0,28%)
A. (Myzorhynchella) Sp	2	(0,19%)
A. (Nyssorhynchus) Sp	1	(0,09%)
Total	1.010	

Capturas em abrigos de animais. Foram feitas capturas em três abrigos de animais: estábulo, abrigo de carneiros e abrigo para aves, sendo este situado no porão do Hotel de Caldas da Imperatriz. Os dois outros ficam acêrca de 100 metros do hotel. A duração dessas capturas foi de 1h10; foram capturados 105 anofelíneos, todos da espécie *A. (K) cruzii*. Temos, pois, uma média horária de 90.

Em resumo :

Número de capturas realizadas	3
Número de capturas positivas	3
Número de anofelíneos capturados	105
Duração total das capturas	1h 10

Média horária : 90

Espécies de anofelíneos capturados :

A. (K) cruzii 105 (100%)

QUADRO N.º 2

RELAÇÃO DAS CAPTURAS EM ABRIGOS DE ANIMAIS

N.º DE ORDEM	DATA	HORA	DURAÇÃO	NATUREZA	N.º DE ANOF. CAPTURADOS	*A. (K) cruzii*
1	29.10	20.00	0.30	Estábulo.....	7	7
2	29.10	20.35	0.25	Abrigo p/aves.....	92	92
3	29.10	21.00	0.15	Abrigo p/carneiros.....		
TOTAIS			1.10	—	105	105

QUADRO N.º 3

RELAÇÃO DAS CAPTURAS COM ISCA ANIMAL

N.º DE ORDEM	DATA	HORA	DURAÇÃO		*A. (K) cruzii*	*A. (M) antunesi*	*A. (Kerteszia) sp*	*A. (N)strodei*	*A. (Arrib.) sp*	*A. (M)lutzi*	*A. (Myzorh) sp*	*A. (Nyssorh) sp*
1	26.10	18.30	1.00	30	29	—	—	—	—	—	1	—
2	27.10	18.00	1.30	15	15	—	—		—	—	—	—
3	28.10	18.00	1.30	193	189	3	—	—	—	—	1	—
4	29.10	17.30	2.00	333	324	9	—	—	—	—	—	—
5	24.11	18.30	2.00	319	302	—	15	2	—	—	—	—
6	26.11	18.00	2.00	54	38	5	—	6	1	3	—	1
7	26.11	18.00	2.00	66	56	1	1	4	4	—	—	—
TOTAIS.....			12.00	1.010	953	18	16	12	5	3	2	1

QUADRO N.º 4

RELAÇÃO DAS CAPTURAS COM ISCA HUMANA

N.º DE ORDEM	DATA	HORA	DURAÇÃO	N.º DE ANOF. CAPTURADOS	*A. (K) cruzii*	*A. (Kerteszia) sp*
1	26.10	14.10	0.10	3	3	—
2	27.10	9.30	0.05	12	12	—
3	18.10	8.05	2.00	119	119	—
4	29.10	18.00	1.30	25	25	—
5	1.11	16.20	0.10	8	8	—
6	2.11	9.35	0.05	6	6	—
7	25.11	8.00	0.30	34	30	4
8	25.11	18.00	2.00	1	1	—
TOTAIS.....			6.30	208	204	4

QUADRO N.° 5

CAPTURAS INTRADOMICILIARES

NUMERO DAS CASAS	CAPTURAS REALIZADAS		
	N.° DE INSPEÇOES EM CADA CASA	RESULTADO	N.° DE MOSQUITOS CAPTURADOS
1	13	+ + ++++++++++++	730
2	1	+	1
3	1	+	21
4	3	+ + +	24
6	2	+ +	6
9	2	+ +	17
10	3	— — +	2
11	2	— +	1
12	2	— — +	2
13	3	— —	0
15	2	— +	1
16	2	— —	0
17	2	— —	0
18	2	— —	0
19	2	— —	0
20	1	+	1
21	2	— —	0
22	1	+	1
23	1	+	1
30A	1	+	10
32	1	—	0
33	1	—	0
34	1	—	0
35	1	—	0
36	3	— — —	0
37	1	—	0
38	1	+	1
40	2	— +	5
41	3	—	0
42	2	+ +	72
43	2	+ +	9
44	2	— +	15
47	1	+	4
48	1	+	11
Alambique	1	+	3
35 casas	71	40 + 31	938

QUADRO N.° 6

RELAÇÃO DAS CAPTURAS INTRADOMICILIARES

N.° DE ORDEM	DATA	HORA	DURAÇÃO	N.° DE INSPEC. DOMICILIARES	N.° DE INSPEC. POSITIVAS	N.° DE ANOF. CAPTURADOS	*A. (K)cruzi*	*A. (K)bellator*
1	26.10	10.20	0.45	1	1	54	54	—
2	26.10	18.30	2.30	1	1	135	135	—
3	28.10	17.30	3.30	1	1	71	71	—
4	29.10	6.00	1.15	1	1	71	71	—
5	30.10	10.30	1.00	2	2	15	15	—
6	30.10	18.30	1.47	4	3	14	14	—
7	31.10	5.30	2.25	5	5	24	24	—
8	1.11	16.25	0.35	1	1	17	17	—
9	1.11	18.40	2.25	3	2	71	71	—
10	1.11	18.40	2.20	4	1	15	15	—
11	1.11	22.30	2.00	1	1	73	72	1
12	2.11	5.30	3.30	8	4	10	10	—
13	21.11	6.00	0.30	1	1	7	7	—
14	3.11	7.30	0.35	1	1	74	74	—
15	3.11	17.30	4.00	10	1	2	2	—
16	3.11	23.30	1.10	1	1	18	18	—
17	4.11	6.00	1.25	4	3	3	3	—
18	5.11	6.00	2.00	5	2	23	23	—
19	5.11	18.00	4.00	11	1	1	1	—
20	5.11	24.00	3.50	1	1	128	128	—
21	6.11	5.30	2.00	1	1	74	74	—
22	24.11	16.05	0.45	1	1	10	10	—
23	25.11	5.30	0.30	1	1	7	7	—
24	26.11	5.30	0.40	1	1	8	8	—
25	25.11	16.50	0.10	1	1	10	10	—
26	4.11	8.10	0.20	1	1	3	3	—
	TOTAIS..		45.57	71	40	938	937	1

Hotel das Caldas da Imperatriz

Foram dissecados 298 anofelíneos da espécie *A. (K) cruzi*, sendo 292 capturados em domicílio e seis com isca humana.

Dos mosquitos capturados com isca humana, examinámos, apenas, o estômago; todos mostraram-se negativos ao exame microscópico. Foram desprezados para o cômputo do índice oocístico.

Examinámos o estômago dos 292 mosquitos capturados em domicílio; em quatro, encontramos oocistos, alguns jovens e outros mais desenvolvidos. Isso corresponde a um índice oocístico de 1,37%. Em 132 dêsses mosquitos, inclusive os que se apresentavam com estômago positivo, dissecámos e examinámos as glândulas salivares, tôdas elas com resultado negativo.

4) COMENTÁRIOS

Os dados epidemiológicos obtidos em Caldas da Imperatriz são apenas o indispensável para orientar as investigações entomológicas para determinação das espécies vetoras.

Obtivemos com segurança o conhecimento de alta endemicidade da malária local; o índice esplênico mostra-se bastante elevado, 65,80%, sendo a maior elevação nos indivíduos menores de 15 anos.

O índice dos Ross mostrou-se muito alto 65,51% total, sendo 75% no grupo etário abaixo de 15 anos e 58,14% acima desta idade. Outro fato interessante é a predominância do *Pl. malariae* sôbre as outras espécies.

O índice parasitário de 13,3%, mostra-se mais elevado entre os menores de 15 anos, 22,7% e de 5,5% para o acima dessa idade.

Uma visão de conjunto dêsses índices mostram que a malária local é de alta endemicidade.

Completada essa parte inicial procurámos estudar a fauna anofélica da região com o intuito de estabelecermos as espécies responsáveis pela veiculação de malária. Procurámos, concomitantemente, conhecer os seus hábitos na fase aquática e alada cujas conclusões passamos a enumerar.

CONCLUSÕES

1. Nas pesquisas que efetuamos em Caldas da Imperatriz, a tribo *Anophelini* compareceu com o gênero *Chagasia* e com os sub-gêneros *Nyssorhynchus, Myzorhynchella, Kerteszia* e *Anopheles* (Grupo *Arribalzagia*) do gênero *Anopheles,* representados pelas seguintes espécies:

   Chagasia: *fajardoi*
   Nyssorhynchus: *strodei* e *argyritarsis*
   Myzorhynchella: *antunesi* e *lutzi*
   Kerteszia: *cruzii* e *bellator*
   Anopheles: Grupo *Arribalzagia*

2. Nas pesquisas larvárias terrestres, predominou o *A.* (*N*) *strodei.* 43,89%)

3. Pesquisamos 2.880 "gravatás", neles colhendo 299 larvas, sendo 290 de *A.* (*K*) *cruzii* e as nove restantes diagnosticadas como *A.* (*Kerteszia*) Sp.

4. A espécie responsável pela transmissão da malária em Caldas da Imperatriz é o *A.* (*K*) *cruzii,* cujo índice oocístico foi de 1,37% (4 estômagos infectados em 292 examinados). Essa especie compareceu nas percentagens de 99,89%, 98,07%, 94,34% e 100%, respectivamente, nas capturas intradomiciliares, capturas com isca humana, com isca animal e em abrigos de animais.

Por aí se vê que o único vetor, *A.* (*Kerteszia*) *cruzii* é uma espécie bromelícula, de hábitos na fase aquática bem diferenciados dos demais vetores de malária até pouco conhecidos, os *Nyssorhynchus,* que se criam nas coleções de água existentes no solo.

O trabalho de combate ao vetor nessa região tem que ser exclusivamente orientado no sentido de destruição das bromélias, diferente portanto do combate aos *Nyssorhynchus* que visa às obras de drenagem e atêrro de coleções de água e emprêgo de larvicidas.

Estudos sôbre a bartonelose
I. A bartonelose dos ratos esplenectomizados e a Penicilina (*)

por

F. Ubatuba e Gessy Vieira

(Com 8 figuras no texto)

O problema da bartonelose, embora pudesse interessar originàriamente aos microbiologistas, suscita também a atenção dos endocrinologistas, devido às relações estreitas entre essa doença e um órgão de fisiologia ainda em muitos pontos obscura: o baço. A circunstância curiosa de que a retirada dêsse órgão produz o desencadeiamento da infecção, coloca o problema no campo da fisiologia, tanto mais que há evidências favoráveis da existência de um mecanismo de proteção de natureza hormonal, como veremos em seguida.

Encarada sob êsse ponto de vista, foi-nos sugerida a questão pelo Dr. Thales Martins, uma vez que sendo pobre de efeitos o quadro da esplenectomia, seria a bartonelose um teste precioso para o estudo das funções do baço.

Como em todo teste torna-se necessário, antes mesmo da sua aplicação como tal, fazer um estudo acurado das alterações em si, para em seguida usá-las como padrão nas intervenções corretoras.

É êste então o objetivo dêste primeiro trabalho, tendo-se aproveitado o material para a verificação preliminar do efeito da penicilina na bartonelose do rato albino esplenectomizado.

Por muitos anos, passou despercebido que o rato, largamente usado como animal de experiência, era sede de um interessante caso de *imunidade de infecção* para um tipo de bactéria de posição sistemática ainda hoje mal definida e de comportamento biológico rico em fatos curiosos. Esta bactéria (genus *Bartonella*), que já foi mesmo aproximada aos protozoários, acha-se numa posição indefinida juntamente com os microorganismos dos gêneros *Grahamella, Eperithrozoon* e *Toxoplasma*. Muitos autores aproximaram as bartonelas das *Rickettsiaceae*, entre nós CUNHA & MUNIZ (9). Só recentemente, por não se conhecer bem o comportamento das bartonelas em relação aos artrópodos hospedadores (insetos e iodideos) e por

(*) Trabalho da Secção de Endocrinologia.

* Recebido para publicação a 1 de junho e dado à publicidade em agôsto de 1944.

serem elas parasitos intra-celulares facultativos (formação de colônias extra-celulares em cultura de tecidos) (43) foram destacadas das riquétsias, tomando-se por base os pontos de vista de COWDRY (6). A possibilidade de vida extra-celular, indica maior complexidade enzimática e, portanto, menores requisitos nutritivos das bartonelas. De qualquer modo porém, elas se aproximam muito das riquétsias, vindo em apoio dêsse modo de pensar a necessidade de ácido ascórbico e de glutationte para o crescimento da *B. bacilliformis*, como observou recentemente GEIMAN (19). Seria interessante estudar o comportamento das bartonelas nos diferentes estádios de metabolismo celular, já que elas vivem na hematia e se reproduzem nas células do retículo-endotélio (11, 15, 51). Segundo ZINSSER & SCHOENBACH (55), há *virus* que se desenvolvem em células de elevado metabolismo; as riquétsias, conforme demostraram PINKERTON & BESSEY (44), se reproduzem ativamente em células em que houve uma depressão na formação do pigmento respirátório de Warburg.

O rato comum de laboratório é portador de bartonelas. Uma vez infectado nas primeiras semanas de vida, estabelece-se o equilíbrio entre a bartonela e o organismo animal; êste equilíbrio é tão sólido e duradouro que o rato se comporta como perfeitamente normal. O fato se ajusta ao quadro da *premunição* de Sergent. Basta a diminuição da resistência do animal, por meio de intoxicações gráves, infecções com protozoários, irradiação do baço com ráios X, esplenectomia e mesmo bloqueios intensos do S. R. E. (4, 46), para ser rompido êste equilíbrio, estabelecer-se um estado de hipoergia e desencadeiar-se uma infecção grave com aparecimento de microorganismos no sangue circulante.

Imunològicamente, o mais importante é que aqui, como em outras parasitóses, não há super-infecção. O rato portador, adulto, com baço íntegro, não é infectado com sangue de rato anemiado; basta a esplenectomia para desenvolver-se a infecção (20). Segundo GOTTESMAN & PERLA, o rato é infectado pela injeção de sangue de adulto anemiado só até três semanas de vida e a esplenectomia antes dessa idade não desencadeia a anemia. Conclusões importantes surgem daí: a imunidade congênita não existe para a bartonela; a infecção se dá no início da vida extra-uterina até a terceira semana (20) ou entre a quarta e a quinta (27); uma vez infectado, o rato se torna portador; o comportamento do baço é então diferente no animal jovem e no adulto.

Corroborando a proteção por parte do baço, já então suspeitada e tendo MARINE & MANLEY (34) obtido sucesso no transplante de baço, PERLA & GOTTESMAN obtiveram uma proteção de mais de 50% com transplantes feitos sete semanas antes da esplenectomia (21). É interessante notar-se que nos animais protegidos o transplante funciona como enxêrto, isto é, há

regeneração e mesmo hiperplasia dos elementos da pôlpa esplênica transplantada, o que se não dá quando não há proteção: os elementos se atrofiam, entram em degeneração e são absorvidos. Também a esplenectomia parcial mostrou que ¼ do baço *"in situ"* protege os animais contra a bartonelose (39). No rato adulto, anemiado experimentalmente pela injeção de sangue infectante ou culturas (raças isentas de bartonela) e no rato infantil, notam-se lesões da pôlpa esplênica (20). É interessante notar-se que os ratos Wistar, criados em condições especiais, não são portadores de bartonela mas altamente sensíveis à bartonelose (18).

O funcionamento de fragmentos de baço transplantados exclui não só a possibilidade de uma influência nervosa no mecanismo de proteção, como também a necessidade da ligação vascular direta com o fígado. Todavia, os extratos alcoólicos e aquosos de baço de boi e de porco não protegem os ratos esplenectomizados (21), mas PERLA & GOTTESMAN (39), apoiados nas experiências de LAUDA & FLAUM (30), insistem em que a proteção se dê por intermédio de uma substância de natureza hormonal, secretada pelas células da pôlpa esplênica. LAUDA & FLAUM verificaram que a retirada do baço de um parabionte não desencadeiava a infecção no par, mas que a esplenectomia do outro animal dava origem à bartonelose em ambos. Posteriormente, PERLA & GOTTESMAN (41) evidenciam uma proteção de 37% dos machos de 6 a 8 semanas e de 66% dos machos de 3 a 5 mêses, com um extrato lipoídico de baço aplicado intra-peritonialmente na dose diária de 1 cm3 (correspondente a 100 grs. de baço) até um mês após a esplenectomia. O resultado, como se pode notar, em relação a uma proteção, não é dos mais brilhantes. Além disso, a técnica usada pelos referidos autores na preparação do extrato talvez não seja adequada. Devemos acentuar que apesar da bartonelose ser um teste cômodo para o estudo de um órgão ainda pouco analisado e de *sequellae* de extirpação reduzidas, não tem havido grandes pesquizas nêste sentido; mas as experiências acima citadas de parabióse, de efeitos muito precoces, mesmo antes de se estabelecerem ligações vasculares amplas, falam a favor de uma ação de tipo humoral. Acharam os mesmos autores (42) que o cobre e o ferro também dão alguma proteção ao rato esplenectomizado mas que a super-dosagem sensibiliza o animal (depósito metálico nas células do S. R. E.). Há aí uma correlação interessante com o trabalho de FELDT & SCHOTT (16) que notaram a impedi-ência da ação específica do salvarsan na febre recurrente experimental após bloqueio do sistema retículo-endotelial.

A imunidade na bartonelose se aproxima então do tipo tissular, na dependência direta das células do S. R. E. Devemos notar desde já que o baço do rato representa, diferentemente do que se observa no coelho e na

cobáia (52), a grande massa de células retículo-endoteliais (em pêso, o baço do rato representa de 0.9 — 1.0% da massa corpórea). Segundo MacMillan (32), só são encontrados quatro nódulos hemo-linfáticos no rato. Se bem que ainda reste dúvida a respeito de serem êstes nódulos tecido esplênico accessório, pelo menos no carneiro, Warthin (53) demonstra a hipertrofia dêsses nódulos após a esplenectomia, mas aponta não haver evidência de eritropoiese nos mesmos. Não é de todo impossível admitir-se então uma ação de suplência dêsses grupos celulares nos animais esplenectomizados, a qual seria inconstante ou insuficiente no rato.

Quanto à etiologia, não há dúvida de que a bartonela seja a responsável pela anemia do rato albino. Em 1932, Gottesman & Perla (23) demonstram claramente o papel dessa bactéria no desenvolvimento da anemia. Do sangue de rato anêmico esplenectomizado isolaram êsses pesquizadores a bartonela em cultura pura no meio de Noguchi para leptospira. É interessante notar-se que já tinham Lwoff & Vaucel (31) isolado de camondongo infectado com sangue de cão com tripanosomiase experimental (*S. cruzi*) uma bartonela semelhante à *B. bacilliformis*, crescendo bem em meio de Noguchi e em meio N.N.N. Gottesman & Perla, no trabalho apontado, fecharam o ciclo de Pasteur com o germen isolado do rato anêmico: a cultura inicial produziu anemia severa em ratos jovens e do sangue dêsses animais foi re-isolada a bartonela, além de ser possível a passagem em série em animais jovens dessa espécie; em coelhos de 3 semanas (os adultos são resistentes à infecção), a mesma cultura produziu anemia e ao 5.º dia foi re-isolada a bartonela; os mesmos resultados foram obtidos em cobáias jovens e em camondongos; em ratos Wistar, sem bartonelas, a cultura produziu anemia, tendo também sido re-isolada a bartonela dêsses animais.

Um fato importante sob o ponto de vista imunológico deve ser apontado. Ford & Eliot (17) não conseguiram demonstrar a existência de anticorpos fixadores do complemento em ratos com bartonelose e nem conseguiram proteção com o sôro dêsses animais, em trabalho subsequente (18).

Em relação ao tipo de anemia e à sua regeneração na hemobartonelose, há fatos bem interessantes que pretendemos estudar posteriormente. Conforme o trabalho de Cruz & Robbins (7), o baço influencia a regeneração sanguínea, mas não podem os autores explicar de que modo se processa essa influência. Trabalharam êles em cães esplenectomizados e anemiados por sangrias ou pela fenil-hidrazina. Êste último tipo de anemia, que apresenta regeneração mais intensa, aproxima-se muito da anemia por bartonelose. Aparecem nas hematias granulações químicas de natureza não hemoglobínica, (corpusculos de Heinz) pois o valor globular não se altera,

e a contagem dêsses elementos com grãos, dos normoblastos (eritroblastos ortocromáticos de Ferrata) e dos reticulocitos, mostra claramente que há uma invasão inicial de tôdas as hematias circulantes. Aumentando o número de reticulocitos, o de normoblastos e o de hematias jovens, sem grãos, vão as hematias primitivamente lesadas desaparecendo. (8) As hematias "velhas" vão sendo paulatinamente fagocitadas e destruidas pelas células do retículo-endotélio (as células de KUPFFER mostram-se altamente ativas nos cães esplenectomizados e anemiados pela fenilhidrazina). Uma vez estabelecidos métodos hematológicos que permitam um trabalho diário, com espoliação desprezível e bom limite de êrro, será o rato o animal de escôlha para o estudo da regeneração dêsse tipo de anemia.

Na bartonelose do rato, uma vez passada a crise anêmica, a regeneração é brutal e se acompanha por uma verdadeira limpeza das hematias parasitadas circulantes, por parte das células histiocitárias. Temos de levar em conta que as hematias parasitadas possam infectar as jovens, diferentemente do que se passa com a fenilhidrazina mas a regeneração é tão intensa e rápida que a comparação talvez possa ser feita. Por outro lado, fato interessante, a não ser logo de início, os reticulocitos (policromatófilos ao Giemsa) e os normoblastos, células da cadeia de evolução da hematia, geralmente não apresentam bartonelas, como verificamos, confirmando trabalhos anteriores (50, 54).

As primeiras referências a uma doença humana caracterizada por sintomas gerais de infecção com erupção cutânea verrucosa, remontam aos tempos de Pizarro. Só em 1870, durante a construção da estrada de ferro Lima-Oroya, quando houve 7.000 vítimas, é que ficou plenamente confirmada a existência da nova entidade nosológica. Daí por deante houve confusão entre Febre de Oroya e Verruga peruana, mesmo após o sacrifício heroico de Daniele Carrion, estudante de medicina em Lima. Em 1885, Carrion auto-inoculou-se com material de verruga, morrendo semanas após com quadro típico de Febre de Oroya. A Expedição do Instituto Harvard, chefiada por Strong (51), baseiada em dados epidemiológicos, na impossibilidade de produzir verruga ou mesmo infecção em animais com sangue de paciente de Febre de Oroya e na transmissão do *"virus"* da verruga a animais, sem aparecimento de bartonelas no sangue circulante ou nas lesões, resultou num relatório que separa as duas entidades mórbidas. Não tardou porém em aparecer a sanção definitiva da identidade etiológica, com os trabalhos de vários pesquizadores, especialmente BATTISTINI (3), NOGUCHI (37, 38), MAYER & KIKUTH (36). Admite-se atualmente que os dois síndromes são aspectos diferentes de uma mesma infecção, a Doença de CARRION, como querem os pesquizadores peruanos. Caracteriza-se a infecção por uma

tríade de sintomas: febre — anemia — dermatite verrucosa; lógicamente, na evolução da doença, a reação histiocitária deve ser posterior à fase sanguínea e não anterior, como aventam GOTTESMAN & PERLA (20). Aliás há referência a casos clínicos que assim se comportaram e o próprio STRONG (51) cita observações em que aparece verruga posteriormente ao período febril, mas as rotúla como casos de Febre de Oroya "complicados" com verruga.

Entre 1901 e 1909, BARTON anuncia e insiste na existência de elementos bacilares no sangue de doentes de febre de Oroya. Em 1913 STRONG descreve e classifica o germen, dando-lhe o nome de *Bartonia*, imediatamente mudado para *Bartonella*. (B. bacilliformis). Entre 1925 e 1928, NOGUCHI estuda detalhadamente o parasito. Para maiores detalhes, remetemos o leitor ao trabalho de SORGE (50). Recomendamos também o estudo de HURTADO (26) sôbre a anemia da doença de CARRION.

Em 1941, WEISS (54) conclui que, sob o ponto de vista patológico, há uma unidade de conjunto bem clara nas bartoneloses, evidenciada pela presença de germens em indivíduos imunizados e pela descoberta de portadores sãos; uma vez passada a crise anêmica nos animais infectados, as formas crônicas (frequentemente acompanhadas de recurrências) se assemelham às do homem e, pelo seu caráter alergizante, podem ser comparadas à sífilis ou à tuberculose.

Todavia, ainda restam pontos importantes a serem esclarecidos. A distribuição geográfica da bartonelose humana é perfeitamente delimitada. Nas bartoneloses animais nunca foram verificadas lesões proliferativas nem siquer equivalentes ao botão verrucoso do homem ou de antropoides experimentalmente infectados com *B. bacilliformis*, como o chimpanzé (*Pan leucoprymnus*) e o orangotango (*Pongo pygmaeus*) (38), o *Pseudocebus* sp. (10) e o *M. rhesus* (51). As bartonelas animais não são cultiváveis ou o são difícilmente, caso contrário se dando com a humana. A *B. bacilliformis* não é sensível aos agentes terapêuticos conhecidos, ao passo que as bartonelas animais cedem com relativa facilidade aos arsenicais (neosalvarsan, atoxil) e ao Bayer S. D. T.

Várias espécies de bartonelas parasitas de animais foram descritas até hoje. Assim sejam: *Bartonella muris* (CARINI, 1915), (*) parasita do rato comum (*Mus norvegicus*); *Bartonella canis* KIKUTH, 1928 (28), parasita

(*) A maioria dos autores menciona *Bartonella muris ratti* Mayer, 1921 (35) mas, de acôrdo com os trabalhos de Faria & Pinto (14) e de Faria & Cruz (15), fica bem evidente a prioridade de *Bartonella muris* (Carini, 1915) (5), pelo que adotamos essa designação para a bartonela do rato.

do cachorro (*Canis familiaris*); *Bartonella rocha-limai* FARIA & PINTO, 1926 (14), parasita de um morcego (*Hemiderma brevicauda*); *Bartonella ranarum* CUNHA & MUNIZ, 1926) (9), parasita da rã brasileira (*Leptodactylus ocellatus*); *Bartonella opossum* REGENDANZ & KIKUTH, 1928 (45), parasito do gambá brasileiro (*Didelphys aurita*) e do *Metachirus opossum; Bartonella muris musculi* SCHILLING, 1929 (49), parasito do camondongo (*Mus musculi*).

Tendo em vista a importância do rato como animal de laboratório, as relações da bartonelose animal com a doença humana, para a qual ainda não há terapêutica eficaz, a ação da penicilina na sífilis (33), principalmente nas lesões cutâneas do tipo condilomatoso (resultado obtido no Hospital Evandro Chagas) e a ação dessa droga na febre recurrente experimental (2), além da ação dos arsenicais nessas infecções e na bartonelose animal, justifica-se o aproveitamento de nosso material para esta indagação. Logo após iniciarmos o nosso trabalho, surgiu mais uma publicação relativa à ação benéfica da penicilina em doença correlata ao problema — a doença de WEIL experimental (24).

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais utilizados em nossas experiências, altamente sensíveis à bartonelose post.-esplenectômica, provieram do biotério geral do Instituto. Usamos ao todo 80 ratos, divididos em quatro lotes, com os quais trabalhamos sucessivamente. No biotério geral são êstes animais mantidos sob uma dieta de pão branco, leite fervido, sais, óleo de germe e óleo de cação; em algumas séries foram substituidos uns tantos animais por outros do biotério da Seção, em melhores condições gerais. Conforme já tinha sido observado por um de nós, êstes animais desenvolvem a bartonelose em alta porcentagem após a retirada cirúrgica do baço (trabalho não publicado sôbre a ineficácia do vanádio como protetor, nessa infecção).

Nunca usamos mais de 15 ratos em gaiolas espaçosas; os controles ficaram sempre em gaiolas idênticas ao lado das dos injetados. Durante todo o período experimental, os animais receberam ração de alimento e água "ad libitum" diàriamente. O alimento constou sempre de pão branco embebido em leite pasteurizado.

A esplenectomia foi praticada de modo usual: anestesia pelo eter comum (Sublime ou Piquete), ligadura em massa do pedículo com sêda n.º 0, tendo-se o cuidado de não incluir excesso de meso no laço, pois com o animal

em jejum é possível a inclusão do pâncreas ou interferência na sua vascularização; sutura em dois planos, muscular e cutâneo.

A fim de controlar mais uma vez a especificidade do baço, fez-se a hepatectomia parcial em seis animais, bem sucedida em cinco. Foram retirados os lobos mediano e esquerdo (cêrca de 2/3 do órgão); após ligadura em massa com categut n.º 1, dando-se ao fio uma tensão que a prática logo ensina, foram seccionados os dois lobos, pràticamente sem hemorragia. O animal que morreu revelou, à necrópsia, uma ligadura perfeita do coto gecoral e intensa hemorragia da parede abdominal.

O contrôle das modificações hematológicas foi feito por punção de uma das veias da cauda; usamos de início uma agulha de secção circular, mas logo notamos maior facilidade na obtenção da gota de sangue com o uso de uma agulha de secção triangular que fere a veia longitudinalmente. Observamos que é preferível puncionar uma cauda suja, mas sêca, do que limpá-la na hora, seja com água, álcool ou éter; a gordura natural do pêlo facilita a formação de uma gota bem delimitada, que não se espraia e que permite a introdução da ponta da pipeta hematológica em seu interior. Tivemos o cuidado de tirar apenas a quantidade justa e necessária de sangue, para evitar qualquer ação expoliativa mais intensa; o rato de 120-150 gr. suporta perfeitamente bem uma sangria, mesmo diária, de 50 mm3.

Os esfregaços, uma vez secos, foram fixados com metanol e corados pelo Giemsa de modo usual (10-15 minutos; 1 gota por cm3 de água destilada).

Para a dosagem da hemoglobina empregamos o método da Heilmeyer & Sundermann (25) modificado por W. Cruz. O método consiste em se fazer a leitura da côr, no fotômetro gradual de Pulfrich, do líquido resultante da hemólise do sangue em água amoniacal a 0.4%. W. Cruz modificou a técnica empregando o filtro S-57, com a mesma cuba do método original (5mm) e 20 mm3 de sangue lacado em 1.98 cm3 de água amoniacal; o produto de E (-log T) por 25 nos dá diretamente a hemoglobina %. Segundo Cruz o método foi controlado pela dosagem do ferro e duplamente testado em colorímetros fotoelétricos diferentes, com resultados perfeitamente comparáveis.

Uma vez colocado o líquido hemolizante numa bateria de tubos, íamos procedendo à retirada das amostras de sangue; o uso de duas pipetas e de uma bateria de três frascos com água destilada, álcool e éter, facilitou-nos imenso o trabalho, permitindo trabalharmos sempre com pipetas limpas e sêcas, sem interrupção. Inicialmente, as medidas no Pulfrich foram feitas no mesmo dia, mas logo tornamos mais cômodo o trabalho. Uma vez que

a permanência do sangue hemolizado por 24 horas ao ambiente não altera os valores lidos ao fotoelétrico, extendemos essa prática ao fotômetro gradual. Na realidade, não sabemos se há qualquer diferença quando se faz a leitura a ôlho e não em fotocélula. Ao ambiente, há uma diferença de tonalidade menos marcada após aeração do líquido, mas bem sensível em alguns casos; essa mudança de tonalidade não corresponde, todavia, a uma mudança do espectro da hemoglobina, como verificamos ao espectroscópico. Por prudência, entretanto, apesar de só nos interessarmos pela variação da hemoglobina na evolução da anemia, conservamos os tubos na geladeira durante a noite. Notamos que a mudança de tom foi muito menos nítida e mesmo não se processou em alguns tubos.

O exame microscópico dos esfregaços foi facilitado do seguinte modo: corremos integralmente seis lâminas, três de sangue normal de rato e três de sangue com bartonela. O exame de 6-10 campos mostra-se suficiente para concluir sôbre a presença ou ausência dos germes, pois os nossos esfregaços, quando mostram bartonelas, elas existem em quantidade impressionante. Usamos objetiva de imersão, prisma binocular x 1.5 e oculares 5; só em casos de dúvida ou de esfregaços defeituosos, lançamos mão de maior aumento.

Os animais foram observados diàriamente quanto à palidês das orelhas e olhos, eriçamento do pêlo, movimentação voluntária e aparecimento de hemoglobinúria.

Os animais que receberam tratamento, foram injetados sempre por via sub-cutânea, no dorso, tendo-se o cuidado de espalhar bem o líquido por expressão e massagem após pinçar o orifício cutâneo com uma pinça de Pean. Dêste modo, obtivemos sempre certeza no rigôr da dosagem. As empolas de penicilina já vieram ao laboratório em garrafa térmica com gêlo picado e daí retiradas sòmente o tempo necessário para a injecção; as ampolas com mais de 0.5 cm3 foram fechadas à lampada para a dose seguinte. Usamos a penicilina bárica, do Instituto Oswaldo Cruz.

Na primeira série, usamos duas injeções diárias de 0,25 cm3 perfazendo 20 U.O. diárias para cada animal. Para a segunda série, a dose foi de 24 U.O. repartida em 3 frações de 0.20 cm3. Os ratos da 3.ª série tomaram 40 U. O. diárias, em 5 doses distribuidas uniformemente nas 24 horas (8, 13, 18, 23 e 4 horas) durante cinco dias seguidos. A medicação foi suspensa no fim de nove dias para a 1.ª série e ao fim de 10 dias para a 2.ª série.

RESULTADOS

Os resultados representados nos gráficos e tabelas anexos, foram obtidos segundo os protocolos de experiência dos quais damos um como exemplo elucidativo (Prot. 1). Os gráficos e tabelas são bem esplicativos e dispensam maiores comentários. Podemos observar que, de um modo geral, atendendo não só ao limite de êrro do método de dosagem da hemoglobina, como também às variações sensíveis dessa taxa hematológica, que não houve qualquer proteção evidente. Como se pode ver nas figuras 1, 2, 3. 5, 6 e 7 o máximo de anemia, considerado pela hemoglobina, se processa violentamente até o 5.º dia após a esplenectomia. Daí por diante, começa a regeneração nos animais que vão sobreviver à crise, sendo que a mortalidade atingida aos

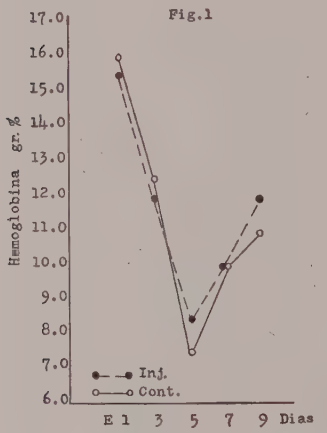


Fig. 1

1.ª Série. Evidência da concordância da variação da hemoglobina nos 2 lotes. 15 ratos injetados e 12 contrôles.

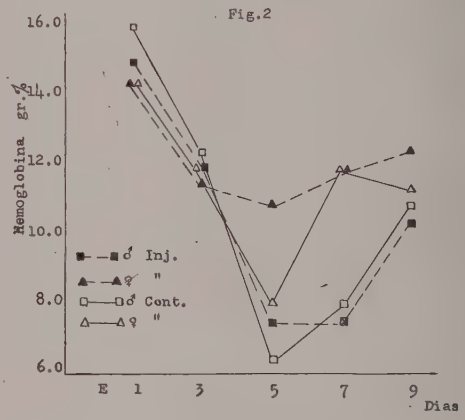


Fig. 2

1.ª Série. A queda da hemoglobina é mais acentuada nos machos. 15 ratos injetados (8 machos e 7 fêmeas) e 12 contrôles (5 machos e 7 fêmeas).

sete dias da operação oscila em tôrno de 50%, com um máximo de 60% para os machos (figuras 4 e 8). As fêmeas são ligeiramente mais resistentes e a anemia é, de um modo geral, menos severa, Também a mortalidade entre as fêmeas é ligeiramente menor do que entre os machos. A fig. 8 mostra-nos uma aparente redução da mortalidade nas fêmeas injetadas, mas temos de levar em conta o reduzido número de animais desse sexo em relação ao total; o contraste é evidente, si observarmos a fig. 4 e a tabela III. Pelo protocolo 3 e demais, o aparecimento da hemoglobinúria é de mau prognóstico, pois ela costuma aparecer, no rato esplenectomizado, 24 a 48 horas antes da morte.

PROTOCOLO 1

PENICILINA E BARTONELOSE EXPERIMENTAL

N.º	PESO GR.	SEXO	DATA ESPLENECTOMIA	0,2 CM³ 3 VEZES AO DIA DURANTE 10 DIAS	HEMOGLOBINA Gr. %						ESFREGAÇOS					OBSERVAÇÕES
					16–3	18–3	20–3	22–3	24–3	4–4	17–3	21–3	23–3	25–3	4–4	
1	110	F	17–3	3×02cc.	13,50	12,75	12,25	9,50	6,25	10,50	N	P	P	P	N	
2	120	F	17–3	3×02cc.	10,25	12,75	12,50	5,50	4,50	10,00	N	P	P	P	N	
3	110	M	17–3	3×02cc.	13,00	14,25	11,00	—	—	—	N	P	—	—	—	
4	125	F	17–3	3×02cc.	12,50	12,00	9,00	5,00	5,75	8,25	N	P	P	P	N	+ 22 3
5	110	M	17–3	3×02cc.	12,50	14,00	13,50	9,00	4,25	6,25	N	P	P	P	N	
6	110	M	17–3	3×02cc.	12,50	14,00	13,50	5,00	3,50	8,50	N	P	P	P	N	
7	100	M	17–3	3×02cc.	11,50	13,00	11,00	3,00	—	—	N	P	—	—	—	
8	115	M	17–3	3×02cc.	11,50	13,50	13,50	2,75	—	—	N	P	—	—	—	Hem. 21–3. + 22–3
9	110	M	17–3	3×02cc.	12,50	13,00	5,50	—	—	—	N	—	—	—	—	Hem 22–3. + 23–3
10	130	F	17–3	3×02cc.	11,50	14,50	13,50	11,50	5,25	—	N	N	P	—	—	Hem. 20–3. + 21–3
11	110	M	17–3	3×02cc.	14,00	13,25	12,25	—	—	—	N	P	—	—	—	+ 22–3
12	100	M	17–3	3×02cc.	11,50	12,50	13,50	3,50	4,00	10,75	N	P	P	P	P	Hem. 21–3.
13	115	M	17–3	3×02cc.	10,50	11,50	10,50	2,50	3,50	9,50	N	P	P	P	N	
14	95	M	17–3	3×02cc.	16,40	13,50	13,50	4,50	4,50	8,75	N	P	P	P	N	Hem. 21–3
15	100	F	17–3	3×02cc.	13,00	13,00	14,00	5,00	6,75	8,00	N	P	P	P	P	
1	115	M	17–3		12,50	13,00	16,50	—	—	—	N	—	—	—	—	
2	105	F	17–3		11,00	12,50	12,50	4,50	6,00	12,50	N	N?	P	—	N	+ 21–3
3	95	M	17–3		12,50	13,25	12,50	1,75	4,00	10,25	N	P	P	P	N	
4	130	F	17–3		12,50	13,75	12,50	2,50	5,25	11,00	N	P	P	P	N	Hem. 21–3
5	120	M	17–3	Controles	12,50	14,25	15,50	6,75	5,75	9,00	N	P	P	P	N	
6	115	F	17–3		12,50	13,25	14,50	—	—	—	N	P	—	—	—	
7	105	F	17–3		17,00	13,00	15,00	4,25	7,50	12,50	N	P	P	P	N	+ 22–3
8	120	F	17–3		13,50	13,75	13,00	2,00	—	—	N	P	—	—	—	
9	100	M	17–3		11,25	16,00	15,00	—	—	—	N	P	—	—	—	+ 22–3
10	100	M	17–3		12,75	16,25	12,50	—	—	—	N	P	—	—	—	Hem. 21–3. +22–3
11	130	F	17–3		14,00	16,25	16,00	3,75	6,50	13,00	N	P	P	P	N	+ 22–3
12	115	F	17–3		16,50	15,50	14,25	—	—	—	N	—	—	—	—	+ 21–3

N = Ausência de bartonelas nos esfregaços.
Hem. = Hemoglobinúria

P = Presença de bartonelas nos esfregaços
+ = Morte do animal

Nos esfregaços, as bartonelas se apresentam com o aspecto típico, já inúmeras vêzes descrito pelos diferentes autores que trabalharam no assunto. Queremos apenas acentuar que as formas em bastonete são raras em nossos preparados, predominando os cocos em cadeias, às vezes de vários elementos. O depósito de corante, muito fino, às vêzes encontrado em certas lâminas, permite-nos uma focalização que nos faz pensar que as bartonelas são endoglobulares, na realidade e que as formas esparsas entre os glóbulos, provenham de hematias fragmentadas, o que é muito comum quando a anemia é muito intensa. Logo de início, aparecem finos grãos nas hematias. Êstes grãos vão aumentando não só de volume como de número com o desenvolvimento da anemia. Em alguns preparados podem contar-se mais de

Fig. 3

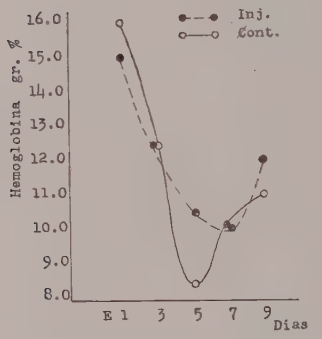


Fig. 3

1.ª Série. Gráfico obtido com os valores médios dos sobreviventes após 9 dias (8 animais para cada lote)

Fig. 4

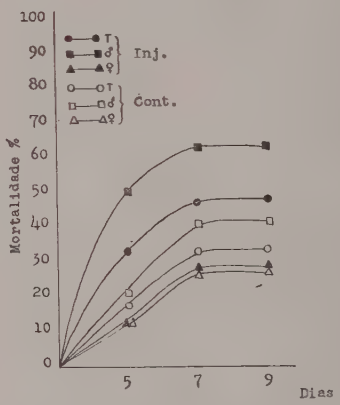


Fig. 4

1.ª Série. A maior mortalidade dos machos elevou a mortalidade média de cada lote. 15 ratos injetados (8 machos e 7 fêmeas) e 12 contrôles (5 machos e 7 fêmeas).

40 elementos numa só hematia e as hematias parasitadas com vários elementos é a regra. As lâminas feitas em plena anemia, mostram apenas hematias parasitadas, sendo que os policromatófilos não apresentam parasitos. O exame porém, de lâminas feitas logo no início, mostra que êles também são atingidos. Baseando-nos no fato de que a série vermelha do rato normalmente já se apresenta em quadro típico de intensa regeneração, acreditamos que a invasão das hematias se dá bruscamente e atinge um máximo logo de início; nêsse período os policromatófilos também são atingidos. A presença dêsses elementos sem bartonela nos dias seguintes deve correr a conta, seja da sua rápida evolução para hematia, seja pela sua destruição,

uma vez que trazem em si o elemento estimulante da fagocitose por parte das células de retículo-endotélio. O processo parece realizar-se do mesmo modo que para a anemia pela fenilhidrazina (pirodina).

Ao fim de 3-4 dias de infecção e anemia, o quadro sanguíneo é tìpicamente regenerativo, caracterizado por anisocitose com macrocitose, intensa policromatofilia, presença de normoblastos e de corpos de Jolly.

De todos os animais, apenas quatro não apresentaram queda evidente da hemoglobina, o que coincidiu com a presença de poucas bartonelas em algumas hematias ao fim de 4-6 dias após a esplenectomia ou mesmo ausência completa do parasito.

Fig. 5

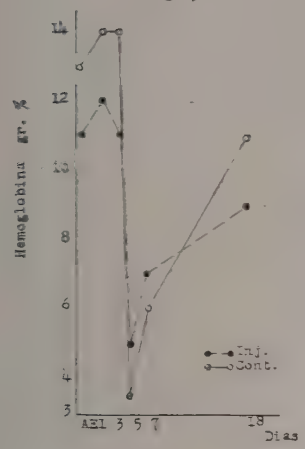


Fig. 5

2.ª Série. Concordância com a fig. 1. 15 ratos injetados e 12 contrôles.

Fig. 6

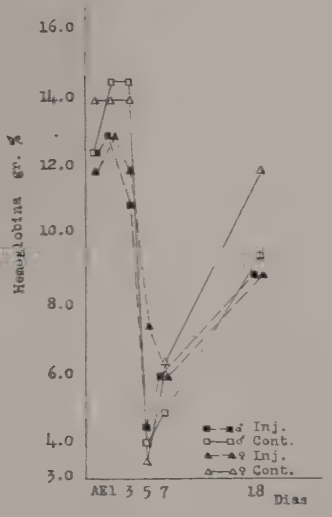


Fig. 6

2.ª Série. Nota-se também aqui maior resistência das fêmeas. 15 ratos injetados (10 machos e 5 fêmeas) e 12 contrôles (5 machos e 7 fêmeas).

Nos ratos em que praticámos a hepatectomia parcial, retirando cêrca de 2 3 do órgão, não conseguimos reproduzir o quadro da bartonelose. Deve-se apontar, porém, que o número de animais foi muito pequeno para se tirar conclusões definitivas. Notamos, porém, uma série de fatos interessantes quanto à influência desta hepatectomia parcial sôbre a função sexual das fêmeas, o que nos despertou a atenção para investigações posteriores. Visando exclusivamente observar o aparecimento da bartonela no sangue cir-

culante e por não notarmos sinais de anemia, tão berrantes na bartonelose, limitamo-nos, sòmente, a fazer esfregaços de sangue. No entanto, eliminando-se qualquer causa de êrro devida ao método de coloração, observamos uma progressiva diminuição da afinidade cromática das hematias para o Giemsa. O campo microscópico apresenta policromatófilos, plaquetas e leucocitos perfeitamente corados, ao passo que os eritrocitos apresentam-se pálidos, difíceis de ver. O fato é interessante, uma vez sabido que a fixação do Giemsa se processa sôbre a própria hemoglobina da hematia, mas merece estudo mais detalhado.

Fig. 7

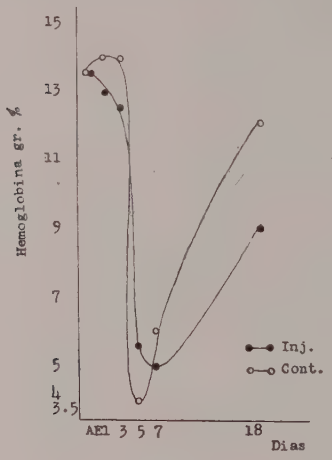


Fig. 7

2.ª Série. Notar a semelhança com a fig. 3 e a curva característica, semelhante à da anemia por fenilhidrazina. 15 ratos injetados e 12 contrôles.

Fig.8

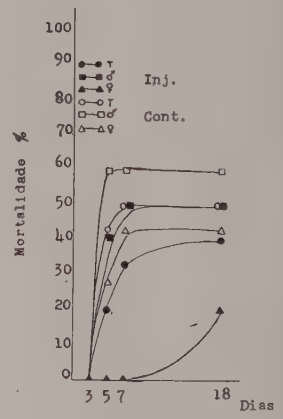


Fig. 8

2.ª Série. Evidencia-se também uma maior mortalidade entre os machos. 15 ratos injetados (10 machos e 5 fêmeas) e 12 contrôles (5 machos e 7 fêmeas).

Estas experiências de hepatectomia foram feitas no sentido de eliminar-se qualquer ação inespecífica da esplenectomia como fator de traumatismo e também pelas relações vasculares fígado-baço. A influência do traumatismo foi apontada por SAUERBRUCH (48). Acha êste autor que a mortalidade verificada em experiências comuns de parabióse decorra como uma consequência da bartonelóse que se desenvolveria no par. Ora, nessas experiências de parabióse o par é constituido por animais com baços íntegros e, segundo SAUERBRUCH o traumatismo, inespecífico no caso, seria o responsável pela bartonelose. A explicação de SAUERBRUCH estaria então em desacôrdo com a experiência já citada de LAUDA; nessa experiência há proteção no caso dos pares constituidos por um animal com baço íntegro e outro esplenectomiza-

do. Ora, se um só baço pode proteger dois animais, como admitir-se que nos pares onde há dois baços essa proteção não se verifique? Aliás, em experiências não publicadas, Thales Martins pôde confirmar a experiência de LAUDA & FLAUM.

DISCUSSÃO

No correr de nosso trabalho, cuja parte experimental visa o estudo das condições em que se processa a bartonelose no rato esplenectomizado e as suas características e a procura de uma ação impediente da penicilina sôbre a bartonelose nestas condições, surgiram vários fatos que merecem ser apontados.

De um modo geral, consideramos a queda da hemoglobina e a sua regeneração em função do tempo de infecção, tanto para o conjunto dos lotes de animais, como para os dois sexos em cada lote, pela média dos valores correspondentes aos animais vivos, durante todo o período. Aproximamos sempre os valores a 0.5 gr %, pois o método não permite maior exatidão. Estudamos também a influência do sexo, não só na mortalidade, como na evolução da infecção e sua gravidade, avaliados pelo número de hematias parasitadas e pelo grau da anemia.

Encontramos divergências entre os autores que trabalharam no assunto, no tocante ao tipo de anemia. Acreditamos que elas resultem não só por diferenças terminológicas como por ser feito o estudo em diferentes períodos da crise anêmica. Segundo SAN MARTIN (47) a queda da hemoglobina se processa mais ràpidamente do que a das hematias, do mesmo modo que a sua regeneração é mais ativa e rápida. Evidentemente, no período regenerativo, que se estabelece ràpidamente, eleva-se o valor globular e o quadro será de uma anemia hipercrômica, macrocítica, já que o reticulocito é normalmente uma celula volumosa. Evidentemente não se pode conferir o têrmo de anemia perniciosa, neste caso, como querem alguns autores latinos; o quadro resulta da ativa regeneração da série vermelha. Não podemos concluir pessoalmente sôbre o assunto baseados em fatos experimentais, por têrmos tomado sòmente a queda da hemoglobina como índice que nos permitiu estudar a sua evolução em relação à bartonela presente ou não nas hematias do sangue circulante.

As nossas duas primeiras séries, confirmando a experiência anteriormente adquirida no laboratório por um de nós, mostram objetivamente que a bartonelose do rato esplenectomizado se desencadeia antes do 6.º dia e

TABELA I

DIAS APOS ESPLENECTOMIA	FREQUENCIA DE BARTONELAS					
	Injetados			Contrôles		
	T	♂	♀	T	♂	♀
Antes.....	0/15	0/8	0/7	0/12	0/5	0/7
1.....	0/15	0/8	0/7	4/12	2/5	2/7
4.....	12/15	8/8	4/7	10/12	4/5	6/7
6.....	6/9	2/3	4/6	4/7	1/2	3/5
8.....	1/8	1/3	0/5	2/8	1/3	2/5

1ª. Série O denominador indica o número de animais vivos e o numerador o de animais com bartonelas.

TABELA II

DIAS APOS ESPLENECTOMIA	FREQUENCIA DE BARTONELAS					
	Injetados			Contrôles		
	T	♂	♀	T	♂	♀
Antes.....	0/15	0/10	0/5	0/12	0/5	0/7
4.....	13/14	9/9	4/5	9/11	4/4	6/7
6.....	10/10	5/5	5/5	6/6	2/2	4/4
8.....	9/9	5/5	4/4	6/6	2/2	4/4
18.....	2/9	1/5	1/4	0/6	0/2	0/4

2.ª Série. O denominador indica o número de animais vivos e o numerador o de animais com bartonelas

já aos 8-9 dias morreu a maioria dos animais infectados. A mortalidade máxima oscila em tôrno de 50%, diferentemente do que observaram PERLA & GOTTESMAN (20). Apontam êstes autores uma maior mortalidade no verão (22), não admitindo uma variação da virulência da bartonela, como quer ADLER (1), mas uma influência climática, baseados nos dados de KIRSCHNER & TIMMERMAN (29). Segundo PERLA, verificaram êstes autores uma mortalidade de 96% em Jerusalém, 30% em Hamburgo e 70% em Sumatra. Todavia, consultando o trabalho apontado, sòmente encontramos os dados referentes à bartonelose experimental do rato albino e do rato doméstico em Bandoeng, Java (40% para o rato doméstico e 75% para o rato albino).

A nossa observação de que a coloração vermelha da urina decorre de hemoglobinúria (ausência de hematias) concorda com a de PERLA & GOTTESMAN (40). A diminuição da resistência globular e a intensa hemocaterese acompanhada de lesão da célula hepática, explicam, não só a icterícia como a capacidade infectante da urina dos ratos anemiados. Também a maior sensibilidade dos machos já tinha sido verificada (12). Evidentemente, não podemos deixar de apontar que as doses de penicilina utilizadas por nós talvez sejam insuficientes. Todavia, não só se encontram na literatura citações de efeitos variados da penicilina, mesmo em doses elevadíssimas, como o comportamento estranho da bartonelose e de outras doenças sensíveis aos mesmos agentes terapêuticos. Assim, AUGUSTINE, em 1944, obtém ótimos resultados com a penicilina na febre recurrente experimental e falência absoluta da droga na tripanosomiase (*T. lewisi*) e na toxoplas-

TABELA III (3.ª série)

LOTES	NUMERO INICIAL DE RATOS ESPLENECTOMIZADOS	SOBREVIVENTES APOS 6 DIAS	TRATAMENTO	ANIMAIS COM BARTONELA		HEMOGLOBINA GR% MÉDIA DOS SOBREVIVENTES	
				Antes da esplenectomia	6 dias após	Antes da esplenectomia	6 dias após
♂	4	3	Penicilina	0	2	13,0	11,5
	5	3	—	0	3	13,0	12,5
♀	6	5	Penicilina	0	1	12,0	13,0
	5	5	—	0	2	13,0	11,5
TOTAL.....	10	8	Penicilina	0	3	11,5	12,5
	10	8	—	0	5	13,0	10,5

mose (2). No entanto, HEILMAN & HERRELL (24) obtem resultados favoráveis na leptospirose icterohemorrágica experimental de cobáios de 250-300 gr, com doses de 100-200-500 e 1.000 U. O. Por outro lado, EMERY (13) observou a ineficácia da sulfamida na bartonelose do rato na dose de 500 mgr. por quilo de pêso. Parece-nos que 400 U. O. por quilo de rato deveriam influir, se tomarmos por base as doses usadas no homem; assim, se a penicilina agir na bartonelose do rato, certamente serão necessárias doses muito maiores, como pretendemos verificar posteriormente.

Somos muito gratos ao Dr. Thales Martins pela orientação segura e apoio em todo momento que nos dispensou e ao Dr. Walter O. Cruz pelo inestimável auxílio que nos prestou quanto à parte hematológica do nosso trabalho.

CONCLUSÕES

1. Os ratos albinos do Instituto Oswaldo Cruz, uma vez esplenectomizados, desenvolvem pràticamente 95% de bartonelose.
2. O início da queda da hemoglobina, na anemia por bartonelose do rato esplenectomizado, coincide perfeitamente com o aparecimento das bartonelas nos esfregaços de sangue circulante.
3. Em nosso meio, o desencadeiamento da anemia, no rato albino esplenectomizado, caracteriza-se por um aparecimento mais precoce (3.º dia) e por uma evolução severa e rápida, em relação aos resultados publicados em outros países.

4. A mortalidade observada, que é mais elevada nos machos, orça em 50%.
5. A hemoglobinúria, atestando a amplitude da lesão orgânica, é um índice prognóstico desfavorável.
6. Em seis animais com hepatectomia parcial não se manifestou a bartonelose em presença de baço íntegro. Embora reduzido o número de experiências, elas sugerem que mesmo um grande traumatismo pode ser insuficiente para desencadeiar a anemia.
7. Na dose de 400 U.O. por quilo de rato, a penicilina bárica fabricada no Instituto Oswaldo Cruz não influencia a mortalidade, o grau de anemia e a intensidade da infecção, nem confere qualquer outra espécie de proteção contra a bartonelose do rato albino esplenectomizado. Assim, se a droga tem algum efeito, só o exercerá em doses muito maiores.

RESUMO

Os A. A., visando aplicar a bartonelose do rato albino esplenectomizado como teste para o estudo das funções do baço, uma vez que há evidência de um mecanismo de proteção de natureza hormonal, estudam a evolução da anemia nesse animal após a esplenectomia.

Discutem os principais aspectos e trabalhos sôbre o assunto. Comparam a anemia da bartonelose à da fenilhidrazina e discutem a influência dos traumatismos inespecíficos sôbre o desencadeiamento dessa infecção. Aproveitam o material para a verificação do efeito terapêutico da penicilina bárica, fabricada no Instituto Oswaldo Cruz, na bartonelose experimental do rato albino. Descrevem os métodos e concluem sôbre a extrema sensibilidade dos animais utilizados e da ineficácia da penicilina, pelo menos na dose empregada.

SUMMARY

The A. A. intending to use *Bartonellosis* of splenectomized rats as a test of spleen functions, since there is evidence of an hormonal protective mechanism, study the evolution of anemia in this animal after splenectomy. They discuss the principal aspects and papers about the subject. They compare the *Bartonella muris* anemia to the phenylhydrazine anemia and the influence of inespecific trauma as regard the appearance of this infection. They profit the material for the verification of the terapeutics effect of ba-

rium penicillin produced at the Instituto Oswaldo Cruz, over the experimental *Bartonella muris* anemia of splenectomized albino rats. They describe the methods and give the results in respect of the extreme sensibility of the animals employed and the ineffectiveness of penicillin at least in the dosage used.

BIBLIOGRAFIA

1) Adler, S.

1930. The results of splenectomy in white mice as indicated by their reactions to Bartonella muris.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 24 : 75-82.

2) Augustine, D. L.

1944. Rapid and sterilizing effect of penicillin sodium in experimental relapsing fever infections and its ineffectiveness in the treatment of trypanosomiasis (T. lewisi) and toxoplasmosis.
Science, 99 : 19 (Jan. 7.)

3) Battistini, T.

1925. Contribución al estudio de la Verruga peruana.
An. Fac. Med. Lima. N.º Ext. Octubre 1.º.

4) Cannon, P. R. — McClelland, P. H.

1929. The reticulo-endothelial system in the infectious anemia of albino rats.
Arch. Path., 7 : 787-800.

5) Carini, A.

1915. Corps de Graham-Smith dans les hématies du Mus decumanus.
Bull. Soc. Pathol. Exot., 8(3) : 103-104.

6) Cowdry, E. V.

1926. Rickettsiae and disease. General Review.
Arch. Path. Lab. Med., 2 : 59-90.

7) Cruz, W. O. — Robbins, R. F. S.

1942. Relationship between the spleen and the morphologic picture of blood regeneration.
Am. J. Med. Sc., 203 : 28-34.

8) Cruz, W. O.

1941. Acetylphenylhydrazine Anemia. 1. The Mechanism of Erythrocyte Destruction and Regeneration.
Am. J. Med. Sc., 202 : 781-798.

9) CUNHA, A. M. — MUNIZ, J.

1926. Sôbre uma nova espécie de Bartonella parasita do sangue e órgãos do Leptodactylus ocellatus.
Boletim Biológico, 2 : 25.

10) CUNHA, A. M. — MUNIZ, J.

1927. Pesquisas sôbre Verruga peruana experimental.
Boletim Biológico, 9 : 135.

11) CUNHA, A. M. — MUNIZ, J.

1928. Considerações a respeito da Verruga peruana.
Sciencia Medica, 6 : 293.

12) EDERLE, W. — KRIECH, H.

1931. Über die Virkung des injizierbaren Leberextrakts nach Gäusslen im Tierversuch.
Klin. Woch., 10 : 25-26.

13) EMERY, F. E.

1940. Treatment of Bartonella muris infection with sulfanilamide.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44 : 56-57.

14) FARIA, J. G. — PINTO, C.

1926. Sur une nouvelle Bartonella (Bartonella rochalimai) parasite de Hemiderma brevicauda, Wied.
C. r. soc. biol., 95 : 1500-1501.

15) FARIA, J. G. — CRUZ F.°, O.

1927. Sur les localisations viscérales de Bartonella muris (Carini)
C.r.soc.biol., 96 : 489-91.

16) FELDT, A. — SCHOTT, A.

1931. Die Rolle des Retikuloendothels beim chemotherapeutischen Heilungsvorgange.
Z. Hyg. u. Infektionskrankh., 107 : 453-471.

17) FORD, W. W. — ELIOT, C. P. (*)

1928. Rat anemia and Bartonella muris ratti.
Tr. A. Am. Physicians, 43 : 95-102.

18) FORD, W. W. — ELIOT, C. P.

1930. Immunity and the mechanism of splenic control in Bartonella anemia of rats.
Am. J. Hyg., 12 : 669-676.

19) GEIMAN, Q. M.

1941. New media for the growth of Bartonella Bacilliformis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47 : 329-332.

20) Gottesman, J. M. — Perla, D.

1930. Studies on Bartonella muris anemia of albino rat. Trypanosoma lewisi infection in normal albino rats associated with bartonella muris anemia. Latent infection in normal adult rats.
J. Exp. Med., 52 : 121-129.

21) Gottesman, J. M. — Perla, D.

1931. Studies on Bartonella muris anemia. Compensatory phenomena following splenectomy in the adult albino rat.
J. Exp. Med., 53 : 877-884.

22) Gottesman, J. M. — Perla, D.

1932. The effect of bilateral suprarenalectomy in adult albino rats on the natural and acquired resistance to bartonella muris anemia.
J. Exp. Med., 55 : 109-110.

23) Gottesman, J. M. — Perla, D.

1932. The etiology of bartonella muris anemia of the albino rat. The isolation of Bartonella muris.
J. Exp. Med., 56 : 763-776.

24) Heilman, F. R. — Herrel, W. E.

1944. Penicillin in the treatment of experimental leptospirosis icterohaemorrhagica (Weil's disease).
Proc. of the Staff meetings of the Mayo Clinic, 19 : 89 (Feb.)

25) Heilmeyer, L. — Sundermann, A.

1936. Dtsch. Arch. Klin. Med., 178 : 397 ("in" La Colorimetrie Clinique a l'aide du Photométre de Pulfrich " Zeiss-Jena pg. 47).

26) Hurtado, A.

1938. La anemia en la Enfermedad de Carrion (Verruga peruana).
An. Fac. Cien. Med. Lima. (1) : 25-224.

27) Jaffe, R. H. — Willis, D.

1928. Bartonella infections in local rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 25 : 242.

28) Kikuth, W.

1928. Über einen neuen Anämieerreger, Bartonella canis nov. spec.
Klin. Woch., 7 : 1729-1730.

29) Kirschner, L. — Timmerman, W. A.

1930. Onderzoekingen over Infectie met Bartonellae bij Ratten in Nederlandsch-Indië.
Geneesk. Tijdschr. Nederland. — Indie, 70 : 235-240.

30) LAUDA, E. — FLAUM, E.

1930. Studien über die Beziehungen der Milz zur Resistenz der ratten gegen die infektiöse Anämie.
Z. ges. exp. Med., 73 : 293-314.

31) LWOFF, A. — VAUCEL, M.

1931. Bartonelloses et infections mixtes.
Ann. Inst. Pasteur, 46 : 258-276.

32) MACMILLAN, R. E.

1928. The so-called hemal nodes of the white rat, guinea-pig, and sheep. A study of their occurence, structure, and significance.
Anat. Rec., 39 : 155-176.

33) MAHONEY, J F. et al.

1943. Penicillin treatment of early syphilis. A preliminary report.
Am. J. Pub. Health, 33 : 1387 (Dec.).

34) MARINE, D. — MANLEY, C. T.

1920. Homeotransplantation and autotransplantation of the spleen in rabbits. Further data on growth, permanence, effect of age, and partial or complete removal of the spleen.
J. Exp. Med., 32 : 113-133.

35) MEYER, M.

1921. Über einige bakterienähnliche Parasiten der Erythrozyten bei Menschen und Tieren.
Arch. f. Schiffs. u. Tropen.-Krankh., 25 : 150-152.

36) MAYER, M. — KIKUTH, W.

1927. Zur Aetiologie und Einheit der Verruga peruviana und des Oroyafiebers. Festschrift Bernhard Nocht 70. Geburtstag. 319-327.

37) NOGUCHI, H.

1926. Etiology of Oroya Fever. The behavior of Bartonella bacilliformis in Macacus rhesus.
J. Exp. Med., 44 : 697-714.

38) NOGUCHI, H.

1926. Etiology of Oroya Fever. The effect of inoculations of anthropoid apes with Bartonella bacilliformis.
J. Exp. Med., 44 : 715-728.

39) PERLA, D. — GOTTESMAN, J. M.

1930. Studies on bartonella muris anemia. The protective effect of autoplastic splenic transplants on the bartonella muris anemia of splenectomized rats.
J. Exp. Med., 52 : 131-144.

40) Perla, D. — Gottesman, J. M.

1931. Studies on bartonella muris anemia. Pathological changes during the acute anemia.
J. Exp. Med. 53 : 869-876.

41) Perla, D. — Gottesman, J. M.

1932. Studies on bartonella muris anemia. A lipoid extract of spleen that prevents bartonella muris anemia in splenectomized albino rats.
J. Exp. Med., 56 : 777-782.

42) Perla, D. — Gottesman, J. M.

1932. Studies on bartonella muris anemia. The protective action of copper and iron against bartonella muris anemia.
J. Exp. Med., 56 : 783-792.

43) Pinkerton, H. — Weinman, D.

1937. Carrion's disease. Behavior of the etiological agent within cells growing or surviving "in vitro".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 2 : 59-90.

44) Pinkerton, H. — Bessey, O. A.

1939. The loss of resistance to murine typhus infection resulting from riboflavin deficiency in rats.
Science, 89 : 368-370.

45) Regendanz, P. — Kikuth, W.

1928. Über Aktivierung labiler Infektionen duch Entmilzung (Piroplasma canis, Nuttalia brasiliensis, Bartonella opossum, Spirochaeta didelphydis).
Arch. f. Schiffs. U. Tropenhyg., 32 : 587-593.

46) Rosenthal, L. — Zohmann, B. L.

1931. Bartonella anemia in non-splenectomized rats.
Arch. Path., 12 : 405-412.

47) San Martin, A.

1930. Das Blutbild der splenectomierten weissen Ratten und ihere Bartonella-Einschlüsse in den roten Blutkörperchen. Inaug. Dissert.

48) Sauerbruch, F. — Knake, E.

1936. Über die Bedentung der Milz bei Parabiosetieren.
Klin. Woch., 15 : 884-886.

49) Schilling, V.

1929. Weitere beiträge zur Bartonella muris ratti, ihere Übertragung auf weisse Mäuse und eine eigene Bartonella muris musculi n. sp. bei splenektomierten weissen Mäusen.
Klin. Woch., 8 : 55-58.

50) Sorge, G.

1929. Le infezioni da "Bartonella" dell'uomò e degli animali. Biologie Medical n.º 10.

51) Strong, R. P. et al.

1915. Report of First Expedition to South America (Harvard School of Tropical Medicine). Cambridge. Harvard University Press.

52) Taliaferro, W. H.

1929. The immunology of parasitic infections. The Century Co. New York.

53) Warthin, A. S.

1902. The changes produced in the hemolymph glands of the sheep and goat by splenectomy, hemolytic poisons, and hemorrhage. J. Med. Res., 7(2, New Ser.) : 435-463.

54) Weiss, P.

1941. Sôbre immunidad en la Verruga peruana. Contribución al estudio comparado de las Bartonellas. Rimac. Lima-Perú.

55) Zinsser, H. — Schoenbach, E. B.

1937. Studies on the physiological conditions prevailing in tissue cultures. J. Exp. Med., 66 : 207-227.

(*) Êste trabalho não foi consultado no original.

Atividade antibacteriana do Aspergillus flavus (*)

por

Adolpho da Rocha Furtado

Biologista

(Com 8 gráficos no texto)

Sumário:

I — Considerações gerais
II — Material e método utilizados
III — Resultados
IV — Conclusões
V — Bibliografia

I — CONSIDERAÇÕES GERAIS

A biologia dos cogumelos tem assumido, ùltimamente, importância capital, em virtude da recente descoberta de diversas substâncias antibióticas.

Desde VAUDREMER (1910, 1913), conhecemos a capacidade antibacteriana de alguns cogumelos; todavia, só após a descoberta da penicilina por FLEMING (1929) êsses estudos cresceram de interêsse e hoje são numerosas as substâncias antibacterianas conhecidas e estudadas.

Em recente revisão de 100 amostras de várias espécies de cogumelos WILKINS e HARRIS (1942) encontraram atividade antibacteriana em 30; de 47 amostras de *Aspergillus,* 18 apresentaram-se com atividade; de 34 amostras de *Penicillium,* 9 foram positivas e das 19 amostras de cogumelos imperfeitos, apenas 3 mostraram-se com atividade. Como vemos, os generos *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais focalizados e os que apresentaram maior percentagem de amostras com atividade antibacteriana.

No presente trabalho, realizado na Seção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, estudamos a atividade antibacteriana de tôdas as culturas de *Aspergillus flavus* da coleção desta Seção. Em outro trabalho, publicaremos os resultados de idêntico estudo em relação às demais amostras de *Aspergillus,* de que dispomos.

(*) Pesquisa e dosagem da atividade antibacteriana de 12 amostras de *Aspergillus flavus* da Seção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz.

* Recebido para publicação a 1 de julho e dado à publicidade em agôsto de 1944.

O *Aspergillus flavus* tem merecido a atenção dos pesquisadores, por ser, reconhecidamente, uma espécie antibiotica. Assim é que *White* (1940) estudou uma amostra de *Aspergillus flavus*, identificada pelo Dr. CHARLES THOM, de Washington, a qual cresce, fàcilmente, em meios líquidos e dá filtrados bactericidas para alguns germes gram-positivos e gram-negativos. Nesse trabalho, WHITE faz referências a outra amostra de *Aspergillus flavus* totalmente inativa e a vários representantes do grupo oryzae-flavus que mostraram resultados discordantes. GLISTER (1941), pouco depois de WHITE, estuda um cogumelo, considerado por êle como *provàvelmente* pertencente ao gênero *Aspergillus;* o autor ignora se há alguma relação com o agente bactericida dos filtrados de cultura do *Aspergillus flavus* descrito por WHITE, mas verificou que inibe o crescimento de organismos gram-positivos e gram- negativos a uma diluição aproximada de 1: 200.000. A substância ativa de GLISTER é, segundo MENZEL, WINTERSTEINER e RAKE (1943), idêntica ao ácido aspergílico, embora as características culturais dêsse cogumelo sejam diferentes das do *Aspergillus flavus*. WHITE e HILL (1942) referem-se a uma amostra de *Aspergillus fravus* (1) isolada, que apresenta atividade em meio com triptona ou peptona, apesar de sua inatividade em meio Czapek-Dox. Tal substância apresentaria atividade contra *Streptococcus beta-hemolyticus A*, à diluição de 1: 40.000 e, a outras diluições, contra *Staphylococcus aureus. Streptococcus fecalis, Aerobacter* e *Escherichia.*

Em 1943, foram descritas três substâncias, produzidas pelo *Aspergillus flavus*: ácido aspergilico, flavicina e flavacidina.

Acido Aspergílico — WHITE e HILL (1943) apresentam seu trabalho original com o estudo de uma substância cristalina ativa isolada por êles de culturas líquidas da amostra de *Arpergillus flavus* de WHITE.

"We propose to call our substance "aspergillic acid", dizem êles nesta publicação.

Sugerem sua composição empirica, que seria C_{12} H_{20} N_2 O_2. Apresenta a atividade antibacteriana contra certas bactérias gram-positivas e gram-negativas e possui toxicidez relativamente alta, embora apresente ação protetora contra infecção experimental dos camondongos com *Streptococcus hemolyticus* e *Pneumococcus*. Os autores fizeram testes qualitativos e quantitativos da atividade antibacteriana do sal sódico do ácido aspergílico.

---

(1) Procuramos, atentamente, a referência bibliográfica correspondente a êste "abstract", publicado no Jl. Bact., 1942, 43 (1) : 12 e não o encontramos; as bibliografias dos outros trabalhos sôbre o assunto não fazem referências a esta publicação de WHITE e HILL em 1942. Isto nos impediu de lêr o trabalho no original

Os primeiros testes nos mostram que, à diluição de 1: 1.000, o ácido aspergílico esteriliza meios com *Staphylococcus aureus, Streptococcus beta-hemolyticus, Aerobacter aerogenes, Streptococcus fecalis* ou *Escherichia coli,* sendo que, à diluição de 1: 5.000, esteriliza os três primeiros.

Os testes quantitativos mostram-nos ainda sua ação bactericida à diluição de 1:5.000, para o *Staphylococcus aureus,* em 2 horas, assim como sua ação bacteriostatica, até a diluição de 1:400.000 para vários outros germes (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Pneumococcus* Tipo I, Grupo A *Streptococcus* 203 e g-*Streptococcus fecalis*).

Do estudo comparativo que os autores fizeram entre ácido aspergílico e sulfanilamida, vê-se que, sôbre *Escherichia coli,* o ácido aspergílico tem uma ação mais pronunciada à diluição de 1:40.000 do que a sulfanilamida a 1:10.000.

JONES, RAKE e HAMRE (1943) publicaram, alguns dias depois de WHITE e HILL, um trabalho de grande interêsse sôbre as propriedades biológicas do ácido aspergílico bruto e purificado. Trabalharam com a própria amostra de *Aspergillus flavus* de WHITE, cultivada em Czapek-Dox e Sabouraud. A atividade anti bacteriana do ácido aspergílico obtido por êstes autores é dosada pelo método de diluição comum, usando *Streptococcus pyogenes* e também pelo teste de antiluminescência. (1).

Comparando as curvas de atividade obtidas por JONES, RAKE e HAMRE (1943) com as nossas, podemos notar que a amostra de *Aspergillus flavus* por êles utilizada não chegou a impedir o *Staphylococcus aureus* em diluição superior a 1:50, nem mesmo com a junção de triptona e açucar ao meio de cultura, enquanto algumas de nossas amostras de *Aspergillus flavus* apresentam atividade antibacteriana total contra o *Staphylococcus aureus* em diluição de 1:80 (culturas n.º 78, 140, 145, 249, 383 e 1.250). O ácido aspergílico isolado por JONES, RAKE e HAMRE apresenta-se muito ativo contra cocos gram-positivos e menos ativo contra os anaeróbios e bacilos gram-negativos.

Flavicina — Esta substância, descoberta por BUSH e GOTH (1943) e anteriormente denominada *aspergilina,* foi obtida de uma cultura de *Aspergillus flavus,* isolada como contaminação de *Penicillium notatum.* A amostra cresce bem em meios ordinários, especialmente, quando adicionada de dex-

(1) A propósito do emprêgo de bactérias luminescentes (*Photobacterium fischeri*) na dosagem de atividade antibacteriana de certas substâncias, RAKE, MCKEE e JONES (1942) fizeram interessante comunicação, pela qual se verifica tratar-se de um processo que permite a leitura dentro de 30 minutos e cujos resultados, em 33% dos casos, são idênticos ao processo de diluição habitual com *Streptococcus pyogenes* C203. O método, segundo afirmam os autores, não se adapta à dosagem da penicilina.

trose ou outros açucares. Semeada em cultura de *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus albus* cresce bem em superfície e os estafilococos são dissolvidos em 2-3 dias a 37.°C. Na dosagem da flavicina, adotam os autores o seguinte critério de unidade antibacteriana: "é a quantidade de substância ativa que, dissolvida em 1cm3 de caldo inibe o crescimento de nossa amostra de *Staphylococcus aureus* (inoculação standard aproximadamente 40.000 organismos por cm3) em 24 horas"; isto significa que o material que apresenta atividade à diluição de 1:1.000 contém 1.000 unidades por cm3. Dentro dêste criterio, as culturas estudadas pelos autores se apresentaram, entre o 6.° e o 8.° dias, com atividade de 10-30 unidades por cm3. E', aproximadamente, a atividade apresentada pela maioria das culturas por nós estudadas. Após purificação parcial, a flavicina produz completa bacteriostase em 24 horas, às seguintes diluições e contra os seguintes germes:

1:625.000 — *Streptococcus hemolyticus* e *Bacillus anthracis.*
1:312.500 — *Corynebacterium diphtheriae.*
1:125.000 — *Staphylococcus aureus* e *S. albus.*
1: 16.600 — *Brucella abortus.*
1: 6.250 — *Bacillus subtilis.*
1: 1.250 — *Eberthella typhosa, Shigella dysenteriae, S. paradysenteriae Flexner* e *Vibrio cholerae.*

A esta última diluição, não eram inibidos *Salmonella paratyphi A., S. paratyphi B, Escherichia coli, Bacillus Friedländeri* e *Pasteurella pestis.*

A flavicina apresenta-se muito tóxica, quando em extrato bruto; à proporção que vai sendo purificada, sua toxicidade vai diminuindo.

Flavacidina — McKee e Mac Phillamy (1943), fazendo a *cultura submersa* do *Aspergillus flavus* (amostra de White), obtiveram uma substância diferente do ácido aspergílico. Por suas características biológicas e químicas, a nova substância apresenta-se muito semelhante à penicilina. O estudo cromatográfico de seu sal sódico (com 240 unidades Florey por mgr.) mostrou que, na sua composição, estavam presentes o Carbono (45,36%), Hidrogênio (4,16%) Azoto (3,02% e Sódio (13,36%). O estudo comparativo da nova substância com a penicilina, no que diz respeito à ação protetora contra infecção experimental dos camondongos pelo *Pneumococcus Tipo I,* veio mostrar, mais uma vez, a grande semelhança das duas substâncias.

Em estudo posterior, McKee, Rake e Houck (1944) dão à nova substância a denominação de *flavacidina.* Em seu filtrado, os autores acreditam que exista também ácido aspergílico em pequenas quantidades, verificadas, espe-

cialmente, pelos testes de antiluminescência. Aliás, a produção de uma ou outra das duas substâncias — ácido aspergílico e flavacidina — pode ser feita com a mesma amostra, diferindo, apenas, o meio de cultura e o método de cultivo. São palavras de McKee, Rake e Houck (144):

> "The production of flavacidin instead of aspergillic acid by *Aspergillus flavus* appears to be a function both of type of medium and method of cultivation, thus when tryptone brown-sugar medium was used aspergillic acid was produced in static cultures and flavacidin in shaken cultures and the method of cultivation was the determining factor. It is probable that all crude filtrates of *Aspergillus flavus* cultures contain an admixture of the two antibiotic substances, the predominating substance being determined by method of cultivation" (pág. 191).

Não sabemos se a substância antibiótica, por nós encontrada e dosada entre as amostras de *Aspergillus flavus*, pertence a alguma destas acima estudadas. Pesquisas posteriores, que esperamos fazer em breve, esclarecerão o assunto.

II — Material e método utilizados

Culturas

Tôdas as culturas utilizadas em nossas pesquisas pertencem à coleção da Seção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz.

Transcrevemos, a seguir, as fichas correspondentes às culturas estudadas:

Cultura n.º 25 — (1921) *Aspergillus flavus* Link, 1791. Determinada por O. da Fonseca; proveniente de Johns Hopkins Hospital, Baltimore; isolada de um caso de otomicose, clínica do professor Crowe; material do doente Mrs. Niller; segundo Thom é um organismo do grupo flavus, mas não inteiramente idêntico ao *Aspergillus flavus* típico.

Cultura n.º 78 — (1921) *Aspergillus flavus* Link, 1791. Determinada por Lasseur; proveniente de Schmitter com a nota: "338 *Aspergillus flavus* Dr. Lasseur Nancy, Vuillemin Lab."

Cultura n.º 140 — (1941) *Aspergillus flavus* Link, 1791. Determinada por C. Thom e M. B. Church; proveniente de Washington, D. C., Estados Unidos da América; isolado do milho; da coleção de Thom, n.º 3.557/9.

Cultura n.º 141 — (1921) *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por C. THOM e M. B. CHURCH; proveniente de United States Department of Agriculture, Washington, D. C.; isolado de forragem; da coleção de THOM, n.º 128 scl.

Cultura n.º 143 — (1921) *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por C. THOM e M. B. CHURCH; proveniente de Demerara; isolado de insetos parasitos da cana de açucar; da coleção de THOM número 2.773.

Cultura n.º 143 — (1921) *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por C. THOM; proveniente de Centralbureau voor schimmelcultures, Amsterdam; da coleção de THOM, n.º 108.

Cultura n.º 145 — (1921) *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por C. WEHMER; proveniente de Hannover.

Cultura n.º 249 — (1921) *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por C. THOM; proveniente da coleção de THOM, com a nota: "Quail" de caso de micose pulmonar dêsse animal; na lista M. B. C.: "Quail, case of aspergillosis"; (obs. Myc. pág. 14).

Cultura n.º 284 — (1921) *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por C. THOM; proveniente da coleção de THOM, com o número 4.402 como vindo de Bangkok; na lista de M. B. C.: "Aspergillus flavus-orizae group. Bread. Bangkok Siam" (obs. Myc. p. 14).

Cultura n.º 383 — (1921) *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por CHURCH; proveniente de sementeira de latas de pickles, isolado por MISS CHURCH; tanto a cultura original, como o repique obtido para a coleção foram feitos em gelose simples pelo que os aspectos caracteristicos não aparecem; sementeira do mesmo material em Czapek-agar, porém, deu *Aspergillus flavus típico* (Obs. Myc. p. 14).

Cultura n.º 473 — (1921 *Aspergillus flavus* LINK, 1791. Determinada por BAINIER; proveniente da Faculté de Pharmacie de Paris.

Cultura n.º 1.250 — *Aspergillus flavus;* a proveniência desta amostra é desconhecida.

Meios de cultura

Antes de passarmos as amostras nos meios de cultura para pesquisa da atividade antibacteriana, repicamos em meio de Czapek-Dox sólido, a fim de trabalharmos com culturas recentes. Quando estas já se acham bem desenvolvidas, fizemos a sementeira em meios líquidos. Trabalhamos com dois meios:

1. Meio de RAULIN, ligeiramente modificado por MOSSERAY:

Sacarose	50,0
Ácido tartarico	0,40
Carbonato de magnésio	0,25
Nitrato de amônio	2,50
Carbonato de potássio	0,40
Fosfato de amônio	0,40
Sulfato de amônio	0,20
Sulfato ferroso	0,05
Sulfato de zinco	0,50

Água destilada q.s. para 1.000 cm3

Esterilizar a 120.°C por 20 minutos (Morfologia y Biologia de los hongos — Técnica Micológica — *Pablo Negroni* — pág. 197).

2. — Meio com levêdo (Fórmula do DR. ARÊA LEÃO)

Levêdo de Fleischmann	10,0
Peptona bacteriológica	10,0
Cloreto de sódio	10,0

Água q.s. para 1.000 cm3

Hidroliza-se o levêdo pela adição de 5 % de ácido clorídrico e aquecimento a vapor fluente por 20 a 30 minutos. Deixa-se esfriar. Ajusta-se o pH a 7,0. Filtra-se em papel de filtro ou lã. Adicionam-se os outros componentes do meio. Reajusta-se o pH a 7,0. Distribuem-se 50 cc. em balões de 250 cm3, de modo que a camada não exceda de 2 cm de altura. Autoclave a 120.°C por 20 minutos.

Tôdas as amostras apresentaram ótimo desenvolvimento, em ambos os meios, à temperatura ambiente.

Método de pesquisa da atividade antibacteriana

A pesquisa da atividade antibacteriana foi feita no 6.° e 12.° dias após a sementeira, obedecendo à seguinte técnica: a 4 cm3 de caldo simples adicionavamos 1 cm3 do meio de cultura a ser dosado e 1 gota de uma cultura de 12 horas de *Staphylococcus aureus*, diluída a 1/20. Agitávamos fortemente o tubo. Partíamos, assim, da diluição inicial de 1/5; quando a esta diluição, a amostra apresentava-se ativa, prosseguiamos, com a técnica habitual, até a diluição de 1/160. A atividade antibacteriana era verificada pela

ausência de turvação do caldo, após 24 horas de permanência na estufa a 37.°C. A leve turvação do caldo era considerada como atividade parcial.

III — Resultados

Como podemos ver dos gráficos e quadro anexos, estudamos, inicialmente, tôdas as culturas de *Aspergillus flavus*, pesquisando a atividade antibacteriana na diluição inicial de 1/5 e apenas no 6.° e 12.° dias. Posteriormente, em uma segunda fase do trabalho, particularizamos a pesquisa, trabalhando com diluições maiores (até 1/160) e durante 14 dias.

QUADRO 1

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AMOSTRAS DE **ASPERGILLUS FLAVUS**

Aspergillus flavus (n.° cultura)	MEIO COM LEVÊDO DILUIÇÃO DE 1/5		MEIO RAULIN & MOSSERAY DILUIÇÃO DE 1/5	
	6 dias	12 dias	6 dias	12 dias
25	±	—	—	—
78	+	+	+	±±
140	+	+	—	±±
141	±	±	—	±
142	—	—	—	—
143	—	—	—	—
145	+	+	+	+
249	+	+	+	+
284	±	—	—	—
383	+	+	—	—
473	±	—	—	—
1.250	+	+	+	+

\+ = Atividade antibacteriana total
± = Atividade antibacteriana parcial
— = Ausência de atividade antibacteriana

Os resultados a que chegamos foram os seguintes:

I — Encontramos atividade total sòmente em seis das doze culturas estudadas (culturas n.° 78, 140, 145, 249, 383 e 1.250).

2 — Quatro amostras apresentaram, apenas, atividade antibacteriana parcial (culturas n.° 25, 141, 284 e 473).

2 — As duas amostras restantes não revelaram atividade antibacteriana (culturas n.° 142 e 143).

Chamamos a atenção para o fato de algumas culturas apresentarem atividade antibacteriana apenas em certo meio; é o caso das culturas ns. 25, 284, 283 e 473 que se mostraram inativas no meio de Raulin & Mosseray, ao passo

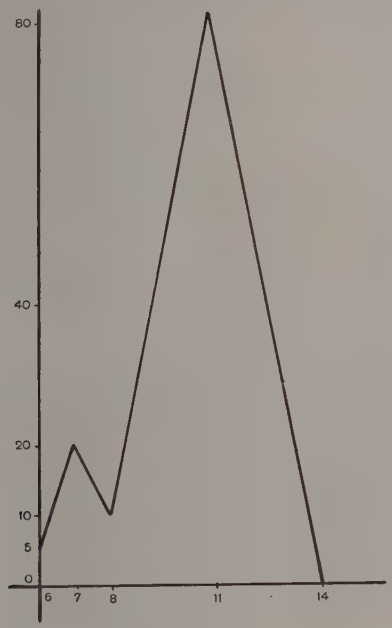


GRÁFICO I — Atividade antibacteriana total das culturas n.° 78 e 383 de *Aspergillus flavus*

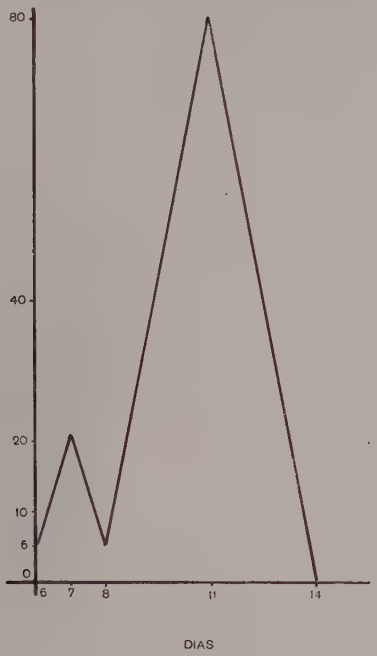


GRÁFICO II — Atividade antibacteriana total da cultura n.° 140 de *Aspergillus flavus*

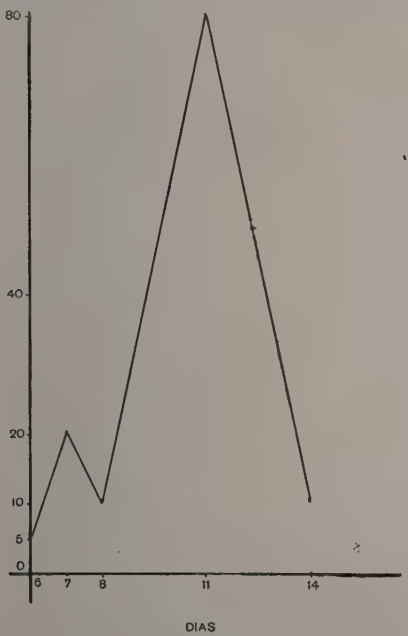


GRÁFICO III — Atividade antibacteriana total da cultura n.° 145 de *Aspergillus flavus*

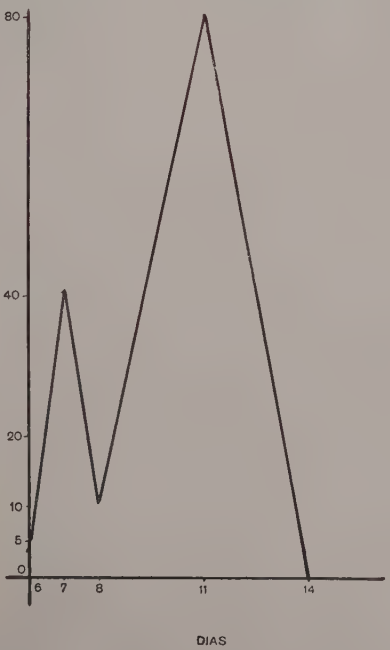


GRÁFICO IV — Atividade antibacteriana total da cultura n.° 149 de *Aspergillus flavus*

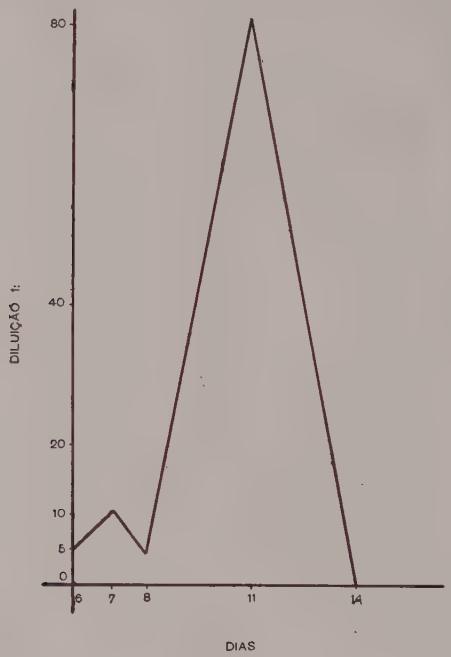


GRÁFICO V

Atividade antibacteriana total da cultura n.º 1.250 de *Aspergillus flavus*

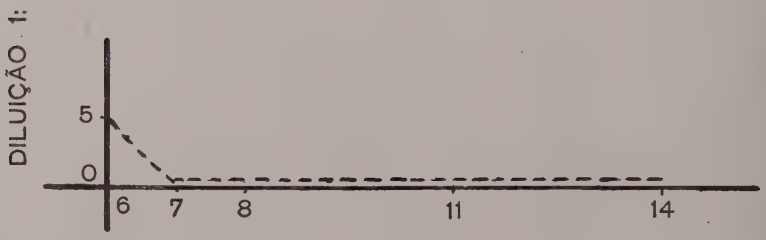


GRÁFICO VI

Atividade antibacteriana parcial das culturas 25 e 284 de *Aspergillus flavus*

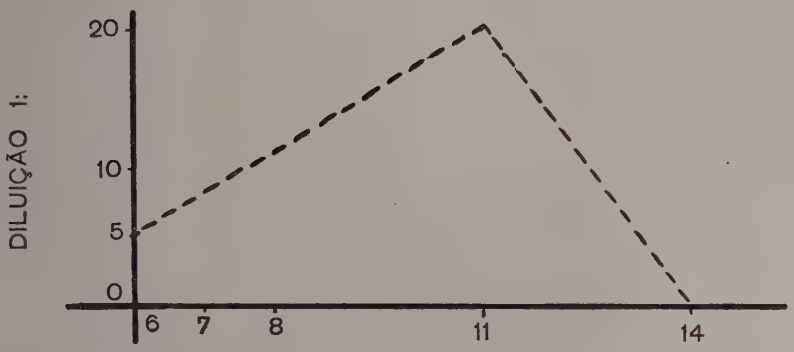


GRÁFICO VII

Atividade antibacteriana parcial da cultura n.º 141 de *Aspergillus flavus*

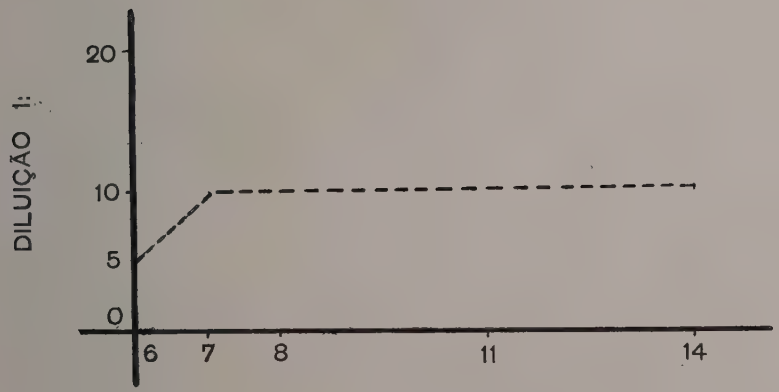


GRÁFICO VIII

Atividade antibacteriana parcial da cultura n.º 473 de *Aspergillus flavus*

que no meio com lêvedo se mostraram com atividade, por vêzes bem alta (cultura n.º 383). Isto nos leva a crer que muitos cogumelos são considerados como desprovidos de atividade antibacteriana, porque ainda não lhes encontramos o meio de cultura adequado.

Outro fato de importância é o tempo de pesquisa. Algumas culturas inativas até o 6.º dia, passavam a apresentar atividade no 12.º dia (culturas números 140 e 141, em meio Raulin). Daí a necessidade de prolongarmos por vários dias a pesquisa, mesmo que se venha apresentando repetidamente negativa.

IV — CONCLUSÕES

— A atividade antibacteriana foi pesquisada entre tôdas as amostras de *Aspergillus flavus* da Seção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz.

— Das doze amostras estudadas, dez apresentaram-se com atividade.

— Na pesquisa da atividade antibacteriana são fatores de importância o meio de cultura e o tempo de verificação.

— Apresentamos nossos sinceros agradecimentos ao Sr. Prof. Dr. ANTONIO EUGENIO ARÊA LEÃO, Chefe da Seção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, pela orientação e assistência que nos deu na organização de todo êste trabalho e à srta. MARIA DEUSDEDIT ARAUJO FRAGA, estudante de medicina, pela colaboração que nos prestou.

Adolpho da Rocha Furtado.

CONCLUSIONS

— The antibacterial activity of all the strains of *Aspergillus flavus* from the Section of Mycology of the Instituto Oswaldo Cruz was studied.

— From twelve strains studied, ten showed antibacterial activity.

— In a study of antibacterial activity the medium of culture and the time of observation are important.

BIBLIOGRAFIA

BUSH, MILTON T. and GOTH, ANDRES

1943. Flavicin: An antibacterial substance produced by an *Aspergillus flavus*. Jl. Pharm. Exptl. Ther., 78 (2) : 164-169.

FLEMING, ALEXANDER

1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit. Jl. Exptl. Path., 10 (3) : 226-236.

FURTADO, ADOLPHO DA ROCHA

Atividade antibacteriana de 180 amostras de *Aspergillus* — A ser publicado.

GLISTER, G. A.

1941. A new antibacterial agent produced by a mould. Nature, 148 : 470.

JONES, HELEN; RAKE, GEOFFREY and HAMRE, DOROTHY M.

1943. Studies on *Aspergillus flavus*. I — Biological properties of crude and purified aspergillic acid. Jl. Bact., 45 (5) : 461-469.

MCKEE, CLARA M. and MAC PHILLAMY, HAROLD B.

1943. An antibiotic substance produced by submerged cultivation of *Aspergillus flavus*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 53 (2) : 247-248).

MCKEE, CLARA M.; RAKE, GEOFFREY and HOUCK, CAROL L.

1944. Studies on *Aspergillus flavus*. II — The production and properties of a Penicillin-like substance — Flavacidin. Jl. Bact. 47 (2) : 187-197.

MENZEL, ARTHUR E. O., WINTERSTEINER, O. and RAKE, GEOFFREY

1943. Note on antibiotic substances elaboratd by an *Aspergillus flavus* strain and by an unclassified mould. Jl. Bact., 46 (1) : 109.

RAKE, GEOFFREY; MCKEE, CLARA M. and JONES, HELEN

1942. A rapid test for the activity of certain antibiotic substances. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 51 (2) : 273-274.

VAUDREMER, ALBERT

1910. Action de quelques microbes sur la tuberculine. Annales de l'Institue Pasteur, 24 (3) : 189-195.

VAUDREMER, ALBERT

1913. Action de l'extrait filtré d'*Aspergillus fumigatus* sur les bacilles tuberculeux. Compt. Rendus Soc. Biol., 74 : 278-280 e 752-754.

WHITE, EDWIN C.

1940. Bactericidal filtrates from a mold culture. Science, 92 : 127.

WHITE, EDWIN C. and HILL, JUSTINA H.

1942. G15 — Antibacterial filtrates from a strain of *Aspergillus flavus*. In. Jl. Bact. 43 (1) : 12.

WHITE, EDWIN C. and HILL, JUSTINA H.

1943. Studies on antibacterial products formed by moulds. I — Aspergillic acid, a product of a strain of *Aspergillus flavus*. Jl. Bact., 45 (5) : 433-442.

WILKINS, W. H. and HARRIS, G. C. M.

1942. Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. I — Preliminary examination of 100 fungal species. Brit. Jl. Exptl. Path., 23 (4) : 166-169.

Tifo exantemático neotrópico no Brasil (*)

Ensaios terapêuticos com a Penicilina

pelos Drs.

Octávio de Magalhães e Adyr Rocha (*)

No tratamento das formas graves do Tifo Exantemático Neotrópico no Brasil (moléstia de Pisa, Gomes e Meyer), já havíamos tentado, sem resultado, 20 drogas diferentes. E' bem verdade que alguns técnicos americanos (Baker e outros) têm aconselhado o emprêgo da Neoarsphenamina dissolvida em Metaphen, com o intervalo de 3 a 5 dias, na terapêutica da Febre Exantemática das Montanhas Rochosas.

Nas formas graves da moléstia brasileira experimental, essas experiências em nossas mãos falharam. Nos casos humanos graves, em os quais o fígado e o rim se apresentam, de regra, profunda e o que mais é precocemente lesados, em os quais a morte de 87 a 100% dos doentes se verifica dentro dos oito primeiros dias da moléstia, em 62,5% dos casos, um medicamento que não haja com grande rapidez sôbre o virus e pouco sôbre os órgãos certamente será ineficaz. E' necessário não esquecer que a maioria dos doentes chega às nossas mãos com três ou cinco dias de moléstia. Alguns permanecem apenas horas no hospital, antes da morte. A insuficiência hepática aguda e precoce, a nefrite com grande azotemia e a acidose que os casos não raros apresentam, desde os primeiros dias da moléstia, tornavam já, suspeita a terapêutica pelos arsenicais. Aliás, as formas graves da moléstia, as únicas que nos interessam no caso, de regra não permitem delongas, na intervenção terapêutica. Ou o medicamento agirá com rapidez ou chegará tarde. Tendo obtido por intermédio da Sra. D. V. Barros, a quem nos confessamos agradecidos, a Penicillina de Merck (Sodium Salt), resolvemos empregá-la experimentalmente, dada a pequena quantidade de material, com a raça VB do vírus Neotrópico no Brasil.

(*) Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz, Divisão de Estudos de Endemias. Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina da U. M. G.

(**). Nota apresentada na seção de 11 de maio de 1944 da Sociedade de Biologia de Minas Gerais.

* Recebido para publicação a 5 de julho e dado à publicidade em agôsto de 1944.

Eis as experiências:

COBAIO N. 7.744 — Peso: 420 g. Inoculado com o vírus VB.

Temperaturas: 39/39, 1/39, 2/39, 0/40, $1/40^1$, $6/40^2$, $4/40^3$, 2/40, 9/40, 9/39, 6/38, 4/38, 4/ + morte.

Reação testicular. Esplenomegalia. Congestão pulmonar.

---

1 = R.t.

2 e 3 = Injeções de Penicillina 1.6000 unid. Oxford via intra-peritonial. Empregadas 4 doses com 6 horas de intervalo.

A passagem do sistema nervoso central dêsse cobaio para o de n. 4.988 revelou a presença do vírus VB de acôrdo com o gráfico adiante.

COBAIO N.º 4.988 — Temperaturas: 38, 8/39, 6/39, 5/39, 6/39, 8/40, 5/40, 8/41, 0/40, 9 (R.t.) /40, 8/40, 0/39, 3/39, 4/ + morte.

Lesões típicas. Sementeiras do fígado e baço estéreis por 5 dias.

COBAIO N. 7.760 — Peso: 270 g. Inoculado com o vírus VB.

Temperaturas : 39, 0/39, 4/38, 8/38, 4/39, 7/40, $4/40^2$, $2/40^3$, 0/ + morte.

Reação testicular. Lesões típicas.

---

2 e 3 = Injeções de Penicillina, 1.000 unid. Oxford, via intra-peritonial. Empregadas 4 doses com 6 horas de intervalo.

O sistema nervoso central dêsse cobaio foi injetado no de n. 7939, que apresentou o seguinte gráfico térmico :

COBAIO N.º 7.939 — Temperatura: 38, 8/39, 0/39, 2/39, 7/40, 5/40, $9/40^1$, $7/41^2$, 0/40, 9/39, 6/40, 2/40, 1/39, 8/39, 9/39, 8/, etc.

Não apresentando reação térmica durante os 15 dias seguintes, findos os quais, moreu apresentando esplenomegalia ligeira.

---

1 = R.t.

2 = Sangria de 3 cc. Inoculação no cobaio 4.654, o qual reagiu típicamente, morrendo com lesões típicas.

COBAIO N. 7.398 — Peso: 350 g. Inoculado com o vírus VB.

Temperaturas: 39, 0/39, 1/39, 4/39, 5/39, 4/40[1], 0/39[2], 1/39, 2/38, 5/ + morte.

Ausência de reação testicular. Ligeiro aumento do baço.

---

1 e 2 = Injeção de 25.000 unid. Oxford de Penicilina, via intra-peritonial, em 5 doses fracionadas, aplicadas com 6 horas de intervalo.

O sistema nervoso desse cobaio foi inoculado no de n. 4.823, que apresentou o seguinte gráfico térmico:

COBAIO N.º 4.823 — Temperaturas: 38, 9/39, 4/39, 7/39, 6/39, 5/40, 2/39, 4/39, 5/40, 0/39, 8/40, 0/39, 9/39, 0/ + sacrificado.

Reação testicular média. Esplenomegalia. Derrame seroso do peritônio.

Inoculamos o sistema nervoso central nos cobaios 4.726 e 4.982.

O 4.726 não agiu tèrmicamente. Foi sacrificado no 13.º dia de moléstia, sem apresentar lesões.

O cobaio 4.982 reagiu e morreu com lesões típicas, de acôrdo com o seguinte gráfico térmico:

COBAIO N.º 4.982 — 39, 4/39, 6/39, 2/39, 5/40, 0/40, 8/41, 0/40, 6/40, 8/40, 7/40, 5/40, 7/ + sacrificado.

Lesões típicas.

TESTEMUNHO

COBAIO N.º 4.752 — Testemunho do vírus utilizado no cobaio n.º 7.398.

Temperaturas: 39, 0/39, 1/39, 0/39, 6/40, 1/40, 7/40, 6/40, 7/40, 8 (R. t.) /40, 8/40, 0/ + morte R. T.

COBAIO N.º 4.654 — Peso: 400 g. Inoculado com vírus VB.

Temperaturas: 38, 8/39, 2/39, 5/40, 1/40, 6/40[1], 7/41[2], 0/39[3], 7/38[4], 1/ + morte.

1 = R.t.

2, 3 e 4 = Sangria de 3 cc. para inocular o cobaio n.º 4.886. Injeção posterior de 30.000 unid. Oxford de Penicillina, via intra-peritonial, em 5 doses fracionadas de 6 em 6 horas. O sistema nervoso central do cobaio n.º 4.654 foi reinoculado no cobaio n.º 4.805.

COBAIO N.º 4.886 — (Presença do vírus antes da Penicillina).

Temperaturas : 39, 0/39, 2/40, 2/40, 4/41, 0/40, 8/41, 0/40, 2/40, 0/ + sacrificada. Lesões típicas.

COBAIO N.º 4.805 — Temperatura: 39, 0/39, 4/39, 9/40, 4/40, 7/40, 4/39, 7/39, 8/40, 8/40, 1/40, 0/39, 7/40, 1/39, 8/39, 1/39, 1/38, 7/38, 4/ + morte.

Ausência de congestão testicular. Baço normal. O sistema nervoso central dêsse cobaio foi passado para o cobaio de n.º 4.973, o qual não reagiu durante 17 dias, sendo sacrificado. Esplenomegalia de 2x1,2 cent. O sistema nervoso central dêste cobaio foi passado para o de n.º 4.758, o qual apresentou o seguinte gráfico térmico: 39, 0/39, 2/39, 5/38, 8/38, 9/40, 6/40, 4/40, 5/39, 6/ + morte. Lesões típicas.

COBAIO N.º 7.857 — Peso: 380 g. Inoculado com o vírus VB.

Temperaturas: 39, 0/39, 0/39, 2/39, 6/39, 2/39, 7/39, 4/39, 8/40, 2/40, 4/40, 8/40[1], 4/38[2], 5/ + morte.

Reação testicular. Esplenomegalia.

---

1 e 2 = Inoculação com 15.000 unidades Oxford de Penicilina, via intra-peritonial, em 3 dóses de 6 em 6 horas.

Com o sistema nervoso central dêsse cobaio reinoculamos o de n.º 4.843, que apresentou o seguinte gráfico térmico: 39, 0/39, 2/40, 0/40, 2/41, 0/40, 9/40, 1/39, 3/39, 2/40, 6/40, 5/38, 5/ + morte.

Reação testicular. Lesões típicas. Sementeira do baço e fígado em agar sangue, estéril.

TESTEMUNHO

COBAIO N.º 7.099 — Testemunho do vírus utilizado no cobaio n.º 3.857.

Temperaturas: 39, 1/39, 1/39, 4/39, 5/39, 4/39, 4/39, 2/39, 6/39, 9/40, 5/41, 1/40, 1/40, 8/40, 2/ + sacrificado R. T.

COBAIA N.º 4.668 — Peso: 300 g. Inoculada com o vírus VB + 5.000 unid. Oxford de Pelicilina, *imediatamente* após a mistura, via intra-peritonial.

Temperaturas: 39, 0/39, 0/39, 2/39, 5/39, 7/40, 4/40, 8/40, 5/40, 5/40, 8 (R. v.) /40, 0/39, 4/39, 2/ + sacrificada.

Reação vulvar com zona de necrose local. Lesões típicas.

O sistema nervoso central foi reinoculado no cobaia n.º 4.840, o qual forneceu o seguinte quadro:
39, 0/39, 1/39, 2/38, 8/39, 2/39, 7/40, 2/40, 7/40, 2/40, 4/40, 0/ + morte.

Reação testicular. Esplenomegalia.

COBAIO N.º 4.753 — Peso: 380 g. Inoculado com o vírus VB + 5.000 unidades Oxford de Penicillina, *após 17 horas de contato na Frigidaire,* via intra-peritonial.

Temperaturas: 39, 2/38, 9/38, 5/38, 9/40, 7/39, 9/ + morte. Esplenomegalia. Ligeira reação testicular.

Peri-epatite purulenta ligeira. As sementeiras do fígado e do baço em agar sangue e simples ficaram estéreis. O sistema nervoso central foi passado para a cobaia n.º 7.925, a qual não reagiu térmicamente nem apresentou R. v. durante 16 dias, quando sacrificada apresentou esplenomegalia (2,5 x 1,5 cm.). O sistema nervoso central foi inoculado na cobaio 4.991, que não reagiu até o 14.º dia, quando sacrificado mostrou baço pequeno.

TESTEMUNHO

COBAIO N.º 4.969 — Testemunho dos cobaios ns. 4.668 e 4.753.

Temperaturas: 39, 0/39, 4/39, 4/39, 7/40, 2/40, 2/40, 6/40, 3/40, 8/39, 8/ + morte R. T.

RESUMO: — Os autores descreveram as experiências com a "Penicilina Merck-Sodium Salt n.º 135", a fim de verificar a ação curativa sôbre a moléstia experimental dos cobaios.

I — Apuraram que as doses pequenas, de 1.600 unid. Oxford, quando inoculadas nas primeiras 24 ou 48 horas do aparecimento da reação febril são impotentes para modificar o curso da moléstia, quer na curva térmica, quer nas manifestações testicular ou esplenomegálica;

II — A Penicilina, quando empregada em doses mais altas, de 25.000 ou 30.000 unid. Oxford em 24 horas, via intra-peritonial, é capaz de provocar a normalização da temperatura, modificando de certo modo a virulência do vírus nos cobaios;

III — faz baixar, com doses altas, mesmo injetada tàrdiamente, a temperatura de todos os animais, atenuando as manifestações viscerais;

IV — o contato direto da Penicillina com o vírus, durante muitas horas, fê-lo perder a virulência.

Concluem que é possível, com doses mais fortes do medicamento, via intravenosa no homem, melhorar talvez a evolução mórbida das formas graves do Tifo Exantemático Neotrópico no Brasil, não devendo ser esquecido que elas matam 88 a 100% dos doentes.

ABSTRACT

The authors described the experiments with Penicillin Merck-Sodium Salt n. 135 in order to verify the curative action on the experimental disease of the guineapig.

I — They found that small doses, of 1,600 units, Oxford, when inoculated during the first 24 or 48 hours of the appearance of the feverish reaction are impotent to modify the course of the disease, whether in the thermic curve, or the testicular or esplenomegalic manifestations.

II — Penicillin, when used in larger doses, from 25,000 to 30,000 units, Oxford, in 24 hours through peritonial cavity is capable of normalising the temperature, modifying to a certain degree the virulence of the virus in the guinea-pigs.

IIII — In large doses, even when injected later, it causes the temperature to fall, in all animals, attenuating the viceral manifestations.

IV — Direct contact of Penicillin with the virus, during many hours, cause it to loose its virulence.

They conclude that it is possible perhaps with stronger doses of the medicine, through the veins in man, to better the morbid evolution of the serious forms of Neotropic Exanthematic Typhus in Brazil, not forgetting the death-rate of the patients is from 88 to 100 per cent.

Contribuição ao estudo das Pasteurellas (*)

Pasteurella intermédia n. sp.

II

Pelos drs.

Octávio de Magalhães e Adyr Rocha **

A impressão que se tem da leitura do capítulo *Pasteurella*, escrita por diversos autores, em épocas diferentes, é que a matéria é ainda uma questão aberta.

A teoria unicista sôbre as espécies descritas será verdadeira? Ou terão razão os pluralistas, para os quais as espécies são várias e só a insuficiência de um processo decisivo e seguro de separação é que permite o engano dos unicistas? Existem apenas três ou quatro espécies realmente diferentes? Enquanto não se chega a um acôrdo razoável, pensámos que o melhor meio científico de estudar o assunto é descrever, com minúcias e precisão possíveis, as formas e a biologia das bactérias dêste grupo, de modo a deixar que uma revisão futura do conjunto já publicado permita grupar melhor os micróbios dessa tribo.

Não resta dúvida que a motilidade, o poder patogênico constante e alto de algumas *Pasteurellas*, a carência de crescimento e fermentações em certos meios de outras, o valor antigênico de muitas, permitem já hoje uma separação racional dentro do grupo. Em alguns casos, a *Pasteurella* é realmente a causadora da moléstia. Em outros casos, porém, tem-se a impressão que são apenas "micróbios de associação", sem valor real na etiologia das moléstias pesquisadas.

Seja como fôr, é uma tribo de micróbios, colocada até agora em segundo plano e que pouco a pouco vem retomando o lugar que merece ter, no seio da Microbiologia. Encontramo-la novamente, em nossos estudos sôbre o tifo exantemático neotrópico entre nós.

O estudo da presente bactéria tem interêsse, não apenas por se tratar de uma nova espécie, senão que também e principalmente pela causa de êrro que nos levaria, se não fôra os cuidados a que sempre nos impusemos, em trabalhos dessa natureza. Trata-se em síntese do seguinte: numa época de epidemia

* Trabalho do Instituto Osvaldo Cruz, Divisão de Estudos de Endemias, e Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina da U. M. G.

** Comunicação à Soc. de Biologia de M. Gerais nas sessões de 28-5-942 e 25-4-944

* Recebido para publicação a 5 de julho e dado à publicidade em agôsto de 1944.

do Tifo Exantemático Neotrópico em Minas Gerais (Moléstia de Pisa-Gomes — Mayer), setembro de 1941, em Belo Horizonte, foco conhecido da moléstia, um doente é removido em estado de inconsciência para o hospital de moléstias infecto-contagiosas da cidade (Hospital Cicero Ferreira), com a nota "de doente suspeito do Tifo Exantemático". Êste doente, sem qualquer informação, morreu dentro de 48 horas. A observação mostrou que êle apre-

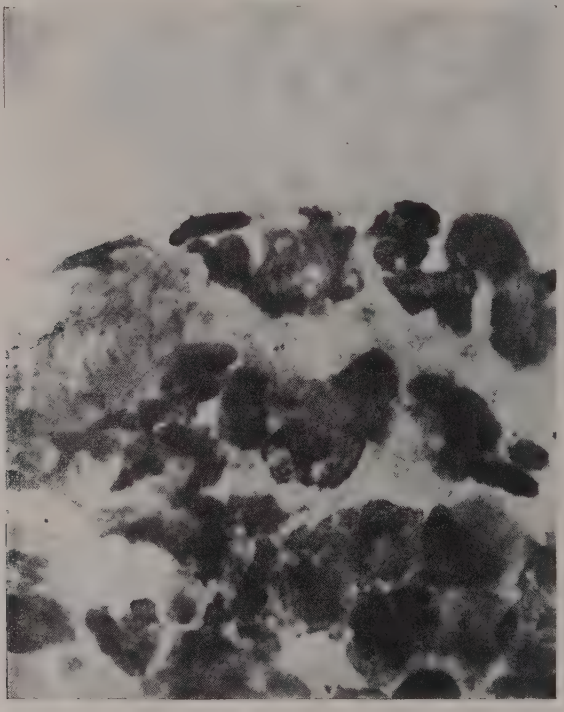


Fig. 1
Fotomicrografia do esfregaço do peritônio. Cobaio inoculado com *Pasteurella intermedia*.

sentava um exantema discreto ao nível das espáduas, abdome e nádegas. Foram feitas a reação de Widal e a hemocultura, as quais foram negativas para os germes do grupo tífico. A necrópsia apurou (vide laudo) que a morte fôra conseqüência de um processo de broncopneumonia. 2 cc. de sangue total dêsse doente fôra inoculado no peritônio de um cobaio de n.º 4.712, o qual apresentou o seguinte gráfico térmico: 38,6/39,7/40,7/40,7/40,5/+

Não houve reação testicular, mas a necrópsia revelou uma intensa esplenite. O triturado do sistema nervoso central dêsse cobaio, durante 23 passagens

sucessivas, provocou reação testicular notável nos cobiaios, febre alta e morte, apresentando os cadávares peri-esplenite e esplenite intensas.

Da raspagem do peritônio encontrávamos células mesoteliais cheias de um micróbio que lembrava as *Rickettsias* (microfotografias 1 e 2) e que mais tarde apuramos tratar-se de formas intra-celulares da própria bactéria que estudávamos.

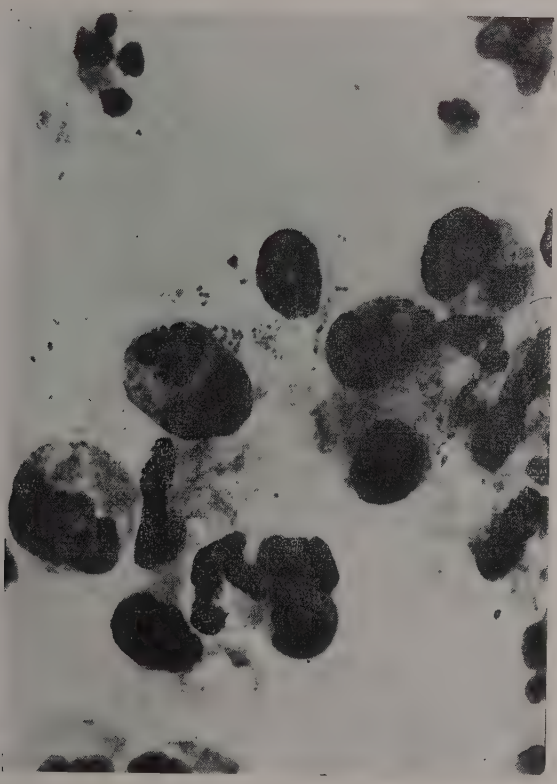


Fig. 2
Aspecto rickettsiforme, intra e extra celular da nova *Pesteurella*, que foi reinsulada em cultura pura do animal.

Que se poderia supor logo? Fôra insulada a raça de virus VB do Tifo Exantemático Neotrópico, de um caso grave ou quase fulminante da moléstia, mantido durante algum tempo em passagens, pela inoculação do triturado do sistema nervoso central dos animais mortos e depois desaparecido por um acidente qualquer, comum em laboratório. Mas teríamos errado dessa vez. Não

era o virus que isclâramos da moléstia brasileira, senão que uma bactéria — a *Pasteurella intermedia* — causadora da moléstia experimental. Quando em boas condições, as sementeiras dos órgãos dos homens e animais mortos pelo virus do Tifo Exantemático Neotrópico no Brasil ficam estéreis.

Do coração, baço e fígado do cobaio n.º 4.712 insulamos pura a bactéria que estudávamos, o mesmo conseguindo do sistema nervoso dos cobaios mortos em passagens sucessivas. As emulsões das culturas puras da bactéria, quando inoculadas nos cobaios, repete com uma constância impressionante o síndromo apurado no cobaio 4.712 e passagens obtidas pela inoculação do sistema nervoso exclusivamente. A confusão tornava-se ainda mais assinalável e o êrro ainda mais possível, porque pelo tamanho com que se apresenta, em muitas das suas formas, a *Pasteureila intermedia* pode atravessar o firtlo Chamberlam B e, dado o seu grande poder patogênico, ser ainda capaz, após a filtração, de matar os animais de laboratório.

Sabe-se hoje que no diagnóstico das moléstias do grupo Tifo Exantemático, de acôrdo com a origem do material, é possível, como infecções intercorrentes, insular os seguintes micróbios, que nada têm que ver com a grave moléstia brasileira:

1.º — Salmonella enteritidis (Gaertner 1888) Castellani e Chalmer
2.º — Toxoplasma caviae Carini e Migliano 1916
3.º — Salmonella Schottmüelleri (Achard et Bensaude, 1896) Bergy e Al
4.º — Spirochaeta morsus-muris 1917 Futaki-Takaki e Osumi
5.º — Spirochaeta icterohemorrhagiae, 1915, Inada, Ido, Hoki e Kaneko
7.º — Pasteureila pestis (Yersin, 1894) Bergey et Al
8.º — Pasterella pseudotuberculosis (Pfeiffer, 1889) Topley and Wilson
9.º — Pasteurella marsupialis 1939, O. Magalhães e Adyr Rocha
10.º — Pasteurella intermedia 1944, O. Magalhães e Adyr Rocha
11.º — Bacillus diphtheroides 1933, Kemp, Hardy sp?
12.º — Proteus X 1885, Hauser.

Dêsses germes, são capazes de produzir reação semelhante à de Mooser-Neil: o Toxoplasma, a S. Schottmülleri, o Spirochaeta morsus-muris e as Pasteurellas marsupialis e intermedia.

Naturalmente a natureza do material exclui a possibilidade de se pensar no Malleomyces mallei (Flügge) Pribam que, injetado via interperitonial em cobios machos, produz a chamada "reação de "Strauss", com tumefação dos testículos, 2 a 8 dias após a injeção infectante, formação de pus e de onde se insula puro o bacilo do mormo.

Os micróbios insulados por Atílio Macchiavello, em 1944, de casos suspeitos de Tifo Exantemático no Equador, afastam-se muito da tribo *Pasteurelleae*.

Eis os caracteres da *Pasteurella intermedia*:

MORFOLOGIA:

Coco-bacilos, insulados ou mais raramente, em curtas cadeias de 2 ou 3 elementos, medindo 0,3 a 0,8 e excepcionalmente atingindo 1,6, profundamente móveis, não tendo cílios, esporos, ou cápsulas, Gram negativos, apresentam coloração bi-polar constante, corando-se fàcilmente pelo Giemas. As formas bacilares apresentam granulações semelhantes às metacromáticas (vide microfotografias ns. 3, 4, 5, 6 e 7). Não se notam elementos filiformes nos meios sólidos

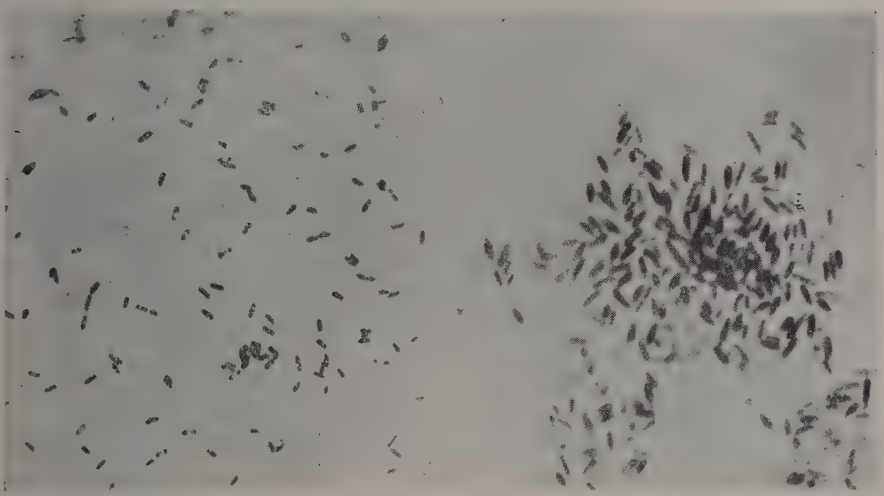


Fig. 3
Megafotomicrografia. 2.600 aumentos. *Pasteurella intermedia*. Vêm-se as granulações descritas no texto.

Fig. 4
Fotomicrografia da *Pasteurella intermedia*. 2.200 *aumentos*.

cu líquidos. Em esfregaços de material de peritônio, ao lado das formas típicas de Pasteurellas, encontram-se outras, intra ou extra-celulares, semelhando *Rickettsias*. Não são ácido álcool resistentes. Temos a impressão que as bactérias muito jovens são coradas maciçamente. São bastonetes cheios. Quase que imediatamente depois aparecem granulações no protoplasma bacteriano, que do centro se afastam para as extremidades da bactéria, onde se adensam, deixando em claro a parte central do protoplasma. Daí a forma Pasteuralla, que seria a definitiva do micróbio adulto.

CULTURAS EM AEROBIOSE:

Gelose simples — Colônias circulares, lisas, regulares, branco azuladas sem umbilicação central, não se notando diferença entre a orla e a parte central (vide Estampa n.º I).

Gelose sangue — Colônias circulares, lisas, brilhantes, regulares, branco-azuladas, sem umbilicação central, não se notando diferença entre a orla e a periféria. Não se nota hemolise do meio.

Gelose-bile — Proliferação abundante em 24 horas, com colônias pequeninas (0,5 a 1,0 mm.), brilhantes, circulares, lisas, regulares, branco-esverdinhadas, sem umbilicação.

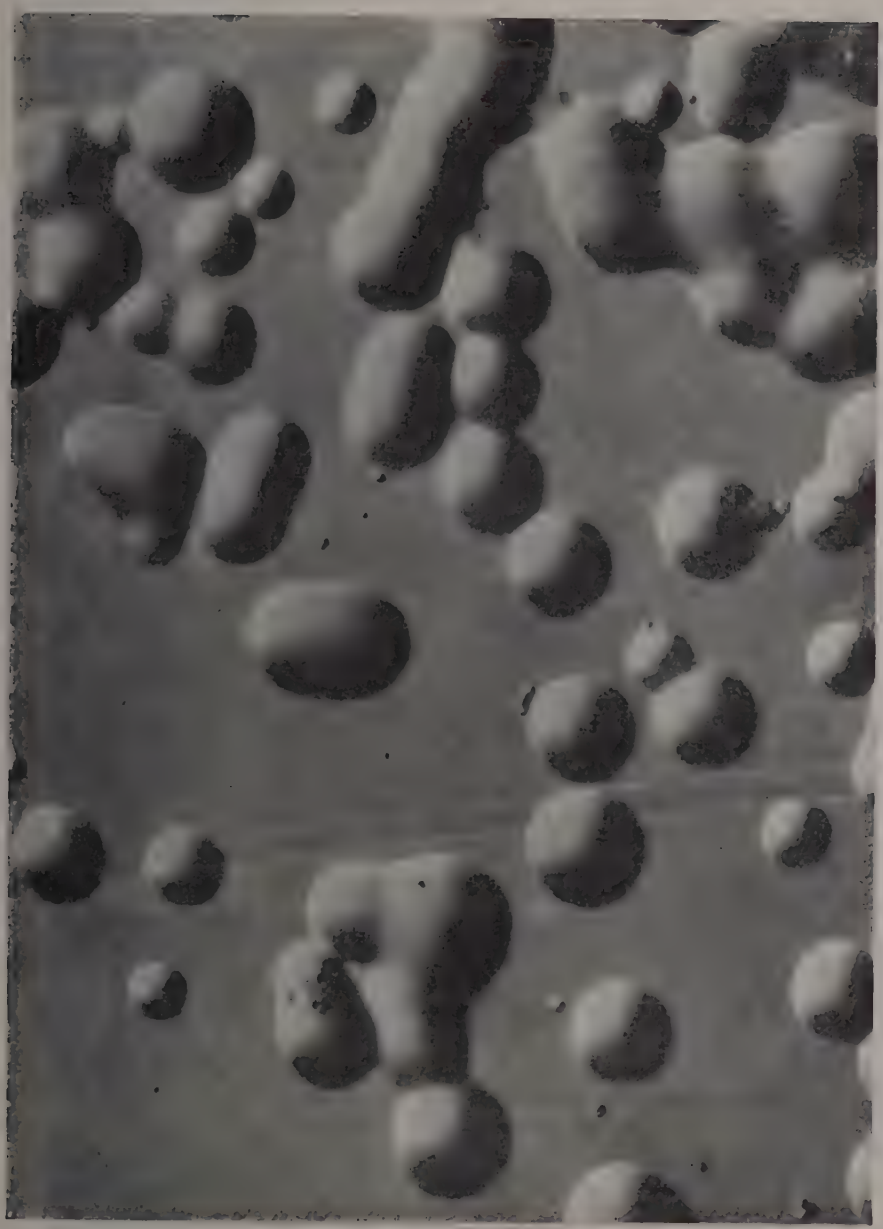
Fig. 5
Metafotomicrografia da *Pasteurella intermedia*. 2.600 aumentos. Forma clássica. Percebem-se em algumas bactérias as g.anulações.

Fig. 6
Fotomicrografia da *Pasteurella intermedia*. 1.200 aumentos.

Gelatina — A sementeira em picada dá colônias circulares, com cêrca de 0,25 a 0,5 mm. de diâmetro, amareladas, não liquefazendo o meio, nem produzindo gases.

Batata — Não prolifera.

Leite tornezolado — Acidifica ligeiramente em 24 horas, alcalinizando posteriormente, sem coagular o meio.



Estampa N° 1 — *Pasteurella intermedia*. Cultura de 24 hs., em placas de agar simples. Para se ver a morfologia das colônias.

Caldo simples — Turvação geral do meio, sem formação de película ou sedimento.

Caldo Peptonado — Turvação do meio, sem produzir película ou depósito.

Caldo com bile — Turvação, com ligeiro depósito não aderente ao fundo e ausência de película na superfície externa.

Endo — Prolifera sem acidificar o meio. Colônias pequenas, regulares, brancas-azuladas.

Löeffler — Proliferação abundante, cremosa, branco-amarelada, brilhante, colônias pequeníssimas.

Estámpa N.º 2 — Cobaio n.º 4.885. Segundo dia de reação térmica, após a injeção de cultura da *Pasteurella intermedia*. Reação testicular com *edema* local.

CULTURA EM ANAEROBIOSE:

Tubo de Vignal — Não prolifera.

Caldo com parafina — Prolifera, turvando o meio com pouco sedimento.

PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS:

Ação sôbre os glucides — Fermenta, sem produzir gases, os seguintes açúcares: Glicose, Galactose, Dextrose, Inolina, Maltose e Manita. Não fermenta, nem produz gases: Lactose, Sacarose, Salicina, L. Arabinose (prolifera neste meio). Fermenta fortemente o d. Sorbitol, não produzindo gases.

Ação sôbre os protides — Acidifica e posteriormente alcaliniza o leite tornezolado, sem provocar coagulação. Não liquefaz a gelatina. Coagula os meios com sôro. Não produz hemólise. Não produz acetil-metil-carbinol.

Indol — Não produz Indol.

Ação redutora — Escurece o meio de gelose com sulfato de chumbo. Não reduz nitratos a nitritos.

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS:

Foi experimentada a patogenicidade desta bactéria nos seguintes animais: cobaio, coelho, gato, cão, gambá, camondongo cinzento, rato branco, morcego, galinha, pombo, canário da terra, tico-tico e *rhesus*.

COBAIO — (*Cavia porcellus*. Vide gráficos ns. 6 e 7) — Êste animal, inoculado por via intra-peritonial ou subcutânea, mesmo com 0,4 de alça de platina, mostra-se sensível, apresentando após 48 horas de regra e 24 horas excepcionalmente, uma elevação térmica, atingindo às vêzes 41°0 C. ou mais, perdurando a febre de 3 a 8 dias, acompanhado de reação testicular, às vêzes intensa e constante (vide Estampa n.° 2). Quando a morte do cobaio é rápida, pela virulência da bactéria, em 4 dias, não há ataque visivel ao testículo, porque a orquite não chega a exteriorizar-se, terminando com a morte do animal.

Os áchados da necropsia são: derrame sero-purulento no peritônio, com peri-hepatite e peri-esplenite, aumento dos gânglios mensentéricos, hepatite e esplenite, congestão dos rins e cápsulas supra renais, testículos, pulmões geralmente limpidos e bem arejados. Ausência de nódulos ao nível dos pulmões ou do peritônio. Em alguns casos, há dilatação do coração e aderências pleurais. A bactéria não atravessa a pele raspada do cobaio, como se opera com a P. pestis.

Coelho — (*O. cuniculi*) — Dois coelhos, inoculados por via peritonial, morreram 72 horas após, com esplenomegalia, ausência de derrame, nódulos ou infartamento dos gânglios na cavidade peritonial. Coração bastante aumentado de volume e, em um dêles, enorme derrame pleural.

Gato — (*Felix domestica*) — Inoculada por via peritonial, morreu 23 dias após, com enorme esplenomegalia, ligeiro derrame seroso do peritônio, ousência de nódulos em qualquer órgão, pulmões claros e límpidos.

Cão — (*Canis familiaris*) — Inoculado por via peritonial, nada apresentou de notável, resistindo à prova.

Gambá — (*Didelphys marsupialis*) — Inoculados por via peritonial, resistiram.

Camondongo Cinzento — (*Mus musculus*) — Morte, após 72 horas.

Rato branco — (*Mus norwegicus*) — Morte após 72 horas, com esplenomegalia, foco de congestão no escroto.

Morcego — (*Hemiderma perspicillatum*) — Foram inoculados 4 morcegos, por via peritonial. Mortes entre 48 horas, com baço pouco aumentado e 9 dias com esplenomegalia, reação testicular, ausência de derrames.

Galinha — (*Gallus domesticus*) — Sobreviveu à prova.

Pombo — (*Columbus domesticus*) — Morte, após 48 ou 72 horas, sem nada apresentar de notável, tendo sido insulada a bactéria do coração.

Canário da terra — (*Sycalis flaveola*) — Inoculados 3 canários, Morte, 48 ou 72 horas após, nada apresentando de notável.

Tico-tico — (*Brachyspiza capensis*) — Inoculadas 2 aves. Morte após 48 horas a 6 dias, tendo apresentado diarréia.

Rhesus — (*Macacus rhesus, Macaca mulatta, Silenus rhesus*) — Inoculado por via peritonial, com 4 cc. de uma suspensão de cultura de 24 horas em agar simples (1,5 alça de platina em 4 cc. de sôro fisiológico), apresentou, após 48 horas, temperatura de 40°0C., pelos arrepiados, triteza, sendo sangrado 48 horas após a inoculação infectante e com 1 cc. de sangue total foi inoculado um cobaio n.° 4.673, o qual morreu, após 9 dias, com esplenomegalia. Nos dias seguintes, o estado geral do macaco melhorou, voltando o apetite e normalizando-se a temperatura. Nos 16.°, 21.°, 26.° dias, se colheu sangue do *rhesus*, para provas de aglutinação com a bactéria em estudos, tendo dado os seguintes resultados: 1:10,240, 1:163.840 e 1:20.480 respectivamente. Dois cobaios inoculados por via peritonial com 5 cc. de sôro, com o poder aglutinante de 1:20,480, foram no dia imediato injetados pela mesma via, com suspenpensão de bactéria, cultura de 24 horas. O quadro térmico mostrou-se típico, bem como as lesões encontradas à necrópsia. Êste sôro, altamente aglutinante para bactéria, não protegeu o cobaio contra a mesma. De todos os animais para

os quais a bactéria foi patogênica, insulamos pura em 1 repique a *Pasteurella intermedia* do coração, baço, fígado e do sistema nervoso central.

FILTRAÇÃO

2 cc. da emulsão de cultura de 24 horas da *Pasteurella intermedia,* em agar-agar, foram prèviamente inoculados, via intraperitonial, no cobaio 7.577 e um pouco semeada num novo tubo de agar testemunho. O cobaio reagiu tìpicamente e morreu no fim de 7 dias, com lesões típicas e a cultura foi positiva para *Pasteurella,* no fim de 24 horas, na estufa a 37°.

A outra parte da emulsão bacteriana foi filtrada em vela Chamberland B., apresentando-se o filtrado com o aspecto de "água de rocha", o qual foi semeado em agar simples e agar-sangue, sendo inoculados 2 cc., via intra-peritonial, no cobaio 4.784. Obtivemos raras colônias insuladas da *Pasteurella,* na sementeira do filtrado e o cobaio sobreviveu. Certamente a quantidade da bactéria que passou no filtro Chamberland B., a quantidade e as formas não foram suficientes para reproduzir a moléstia experimental do cobaio.

RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA

É sabido que a virulência das *Pasteurellas* pode ser aumentada consideràvelmente, pela passagem em animais. Hutyra cita a *P. avicida* que, pelas passagens sucessivas, pode matar cobaios, diluídas a 1/100.000.000. Mas nos meios comuns de cultivo, de regra, elas perdem e perdem ràpidamente, quase completamente, a virulência.

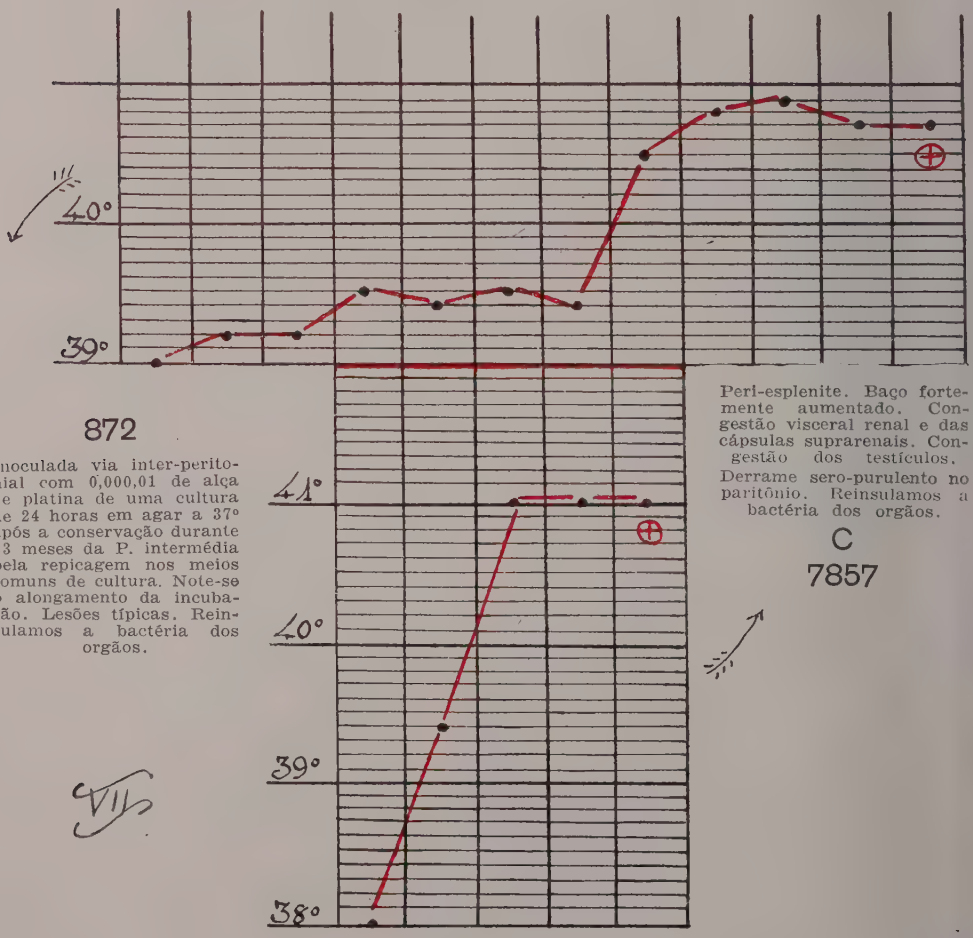
Uma das características da *Pasteurella intermedia* é justamente e também o seu alto poder patogênico para quase todos os animais comuns de laboratório, mesmo após um longo tempo de conservação, *sem passagem por animal,* nos meios comuns de cultura, à luz e temperaturas comuns de laboratório, até 33 meses (época dêste trabalho). Ela morre em 5 minutos, à temperatura de 60° C. e resiste, em suspensão no sôro fisiológico, à temperatura próxima de 0° (Frigidaire), durante 70 dias, matando ainda após êsse tempo o cobaio, com lesões típicas, das quais se insula pura a bactéria. No sistema nervoso central dos animais mortos com a moléstia experimental e mantido nas vizinhanças de 0° C., a *Pasteurella intermedia* é conservada viva e virulenta durante 34 dias, após o que ainda mata cobaios com lesões características, delas se insulando o micróbio, em culturas puras. Esta conservação pelo resfriamento seria ainda outra causa que concorreria para o nosso êrro de supormos a presença do virus do Tifo Exantemático Neotrópico, o qual, de regra, no laboratório, se mantém pela conservação do sistema nervoso central dos animais mortos pela moléstia experimental, em temperaturas próximas de 0° C. Um cobaio de 400 grs. morre

certamente com 0,4 de alça de platina de uma cultura de 24 horas em agar a 37° C. da *Pasteurella*, quando injetada por via peritonial.

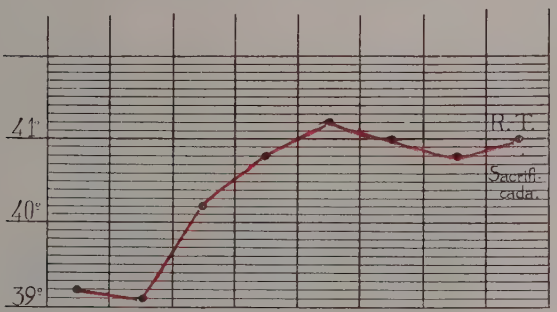
0,01 de alça de platina de uma emulsão em sôro fisiológico, de uma cultura de 24 horas a 37° C. no agar, mata em 6 dias um cobaio de 280 grs., via intra-peritonial, com o seguinte qaudro térmico, cobaio n.° 4.694: ..... 39,0/39,5/40,2/40,5/39,5/+. Necrópsia: Congestão intensa dos rins, cápsulas dos rins, cápsulas supra-renais e peritônio. Enorme esplenomegalia, peri-hepatite e peri-esplenite. Cultura pura dos órgãos.

0,000.01 de alça de platina da mesma cultura ainda é capaz de fornecer culturas esparsas no agar e matar, quando a diluição é injetada no peritônio do cobaio, com o seguinte gráfico térmico, apenas alongando o tempo de incubação: cobaio n.° 872 (vide gráficos ns. I e II).

Gráfico n.° I

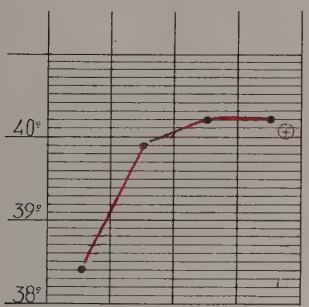

40°
39°
872
Inoculada via inter-peritonial com 0,000,01 de alça de platina de uma cultura de 24 horas em agar a 37° após a conservação durante 33 meses da P. intermédia pela repicagem nos meios comuns de cultura. Note-se o alongamento da incubação. Lesões típicas. Reinsulamos a bactéria dos orgãos.
41°
40°
39°
38°
Peri-esplenite. Baço fortemente aumentado. Congestão visceral renal e das cápsulas suprarenais. Congestão dos testículos. Derrame sero-purulento no paritônio. Reinsulamos a bactéria dos orgãos.
C
7857

Pastêurella intermédia.
Inoculações em cobaias



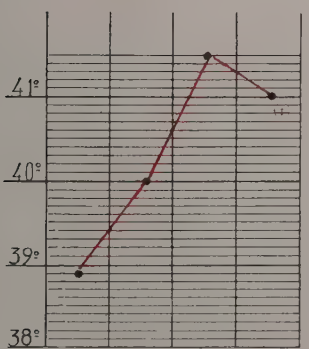
Caso 4649

Derrame sero-purulento e sanguinolento do peritônio. Peri-esplenite e esplenite. Congestão renal e das supra-renais. Reação testicular. Reinsulamos a bactéria do coração, baço e fígado.



R. T. Esplenite e peri-esplenite. Derrame sero-purulento do peritônio. Sementeira do fígado, baço e coração, positivas.

Caso 4831



R. T. Esplenite e peri-esplenite, peri-hepatite. Derrame sero-purulento do peritônio e derrame seroso da pleura. Sementeira do fígado, baço e coração positivas.

Caso 4870

É preciso assinalar que a bactéria mata 100% dos cobaios, durando a incubação 2 a 3 dias e a evolução mórbida posterior, febril, variando em durabilidade de 3 a 6 dias. A febre nos cobaios é sempre muito alta. Só conseguimos ver escapar 2 cobaios inoculados, aliás, com o sistema nervoso central de outras mortas pela bactéria, e que devia conter o micróbio. Aliás êsses dois cobaios de ns. 4.805 e 7.084, reinoculados posteriormente com a raça VB do Tifo Exantemático Neotrópico no Brasil, morreram com reação e leseõs típicas da moléstia experimental dêsse virus.

É preciso assinalar mesmo que, no preparo de sôros aglutinantes em coelhos, para a *Pasteurella intermedia*, tivemos que abandonar a técnica da inoculação de culturas vivas após as mortas, porque não conseguíamos fazer com que os coelhos resistissem convenientemente às inoculações do germe vivo. Um coelho com 1 quilo e 200 grs., inoculado com 0,06 de alça de platina de cultura de 24 horas da *Pasteurella intermedia*, via subcutânea, mrore ràpidamente, entre 2 a 3 dias, ainda quando antes tenha recebido, em espaços convenientes, 5 doses crescentes de cultura morta de bactéria.

IMUNIDADE

Produção de anticorpos

O sôro dos animais sensíveis aglutina em altos títulos a bactéria. Essa é mesmo uma das diferenças capitais, que coloca à parte, no grupo das *Pasteurellas*, a *marsupialis* e a *intermedia*. O sôro dos coelhos e do macaco *rhesus* aglutina fortemente a bactéria. Temos, aliás, a impressão que estas duas *Pasteurellas* têm antígenos somáticos comuns ou muito próximos, se bem que outros caracteres biológicos, como veremos adiante, as separem completamente.

Vacinamos coelhos com doses crescentes de culturas mortas da *Pasteurella intermedia*. Os animais receberam de 4 em 4, durante 32 dias, doses crescentes da bactéria por via subcutânea, iniciando-se as doses com 750 milhões, até 12 bilhões por 1 centímetro cúbico de emulsão. No fim dêsse tempo, o sôro dêsses coelhos aglutinava a bactéria, a um para cinco mil (1:5.000).

A bactéria viva produz muito maior reação do organismo do que quando morta. O macaco *rhesus*, como já vimos, reagiu à infecção experimental pela bactéria viva, via intra-peritonial, com febre e uma septicemia, o sôro deu um alto título aglutinante máximo de 1:163.000 (um por cento e sessenta e três mil), em 20 dias após a inoculação infectante.

Êste alto título caiu ràpidamente. Com o objetivo de separar esta singular *Pasteurella*, resolvemos tentar outras provas sorológicas sabido como são parcas e ávaras, neste grupo, semelhantes reações de imunidade. Para isto, pre-

paramos coelhos, inoculando culturas mortas de *Pasteurella avicida* e *Pasteurella marsupialis*. Fizemos também provas de aglutinação com a *Saolmonela Schottmüelleri* e a *Salmonela paratiphi*, empregando os soros padrões de alto título aglutinante para essas últimas bactérias, do Inst. Osv. Cruz do Rio de Janeiro.

Finalmente tentamos ainda provas de fixação do complemento, empregadas qualitativa e quantitativamente com os soros *anti-P., marsupialis, P. avicida* e *P. intermedia*.

Eis os resultados:

AGLUTINAÇÕES

Coelho n.º 1 — Sôro anti-P. intermédia — Título aglutinante = 1/5.120
Coelho n.º 2 — Sôro anti-P. marsupialis — Título aglutinante = 1/81.120
Coelho n.º 3 — Sôro anti-P. avicida — Título aglutinante = 1/80.

PROVA CRUZADA

Sôro	*Bactéria*	*Resultado*
N.º 1 — P. intermedia +	Past. marsupialis	1/10.240
	" avicida	Negativa
N.º 2 — P. marsupialis +	Past. intermedia	1/5.120
	" avicida	Negativa
N.º 3 — P. avicida +	Past. marsupialis	1/40
	" intermedia	Negativa
N.º 4 — P. intermedia +	S. Schottmülleri	Negativa
N.º 5 — S. Schottmülleri Do Inst. O. C. Rio Título = 1/10.000	Past. intermédia	1/40
N.º 6 — S. paratiphi + Do Inst. O. C. Rio Título = 1/30.000	Past. intermedia	Negativa

Com essas provas de aglutininas, a *Pasteurella intermedia* se insula das demais e forma, com a *marsupialis*, um grupo bem definido dentro da tribu *Pasteurelleae*, de acôrdo ainda com as provas culturais e o poder patogênico atrás referidos.

REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

a) *Qualitativa*:

Preparados e dosados prèviamente os antígenos, o complemento e o sôro hemolítico, inativos os soros suspeitos que íamos dosar, tentamos as provas com as respectivas testemunhas. Os antígenos eram culturas dessas bactérias de 24 horas, em agar na estufa, a 37°, emulsionados em sôro fisiológico, mortas pelo calor a 60° C.

	ESPÉCIE DE SÔRO	ESPEC. DA BACT.	RESULTADO
	1) P. marsupialis +	P. marsupialis	++++ fort.te positiva
a) direta	2) P. intermedia +	P. intermedia	++++ fort.te positiva
	3) P. avicida +	P. avicida	+ fracam.te positiva
	4) P. marsupialis	P. intermedia	+++ fort.te positiva
	5) P. marsupialis	P. avicida	0 negativa
	6) P. intermedia +	P. avicida	++++ fort.te positiva
b) cruzada	7) P. intermedia +	P. marsupialis	++++ fort.te positiva
	8) P. avicida	P. marsupialis	++++ fort.te positiva
	9) P. avicida +	P. intermedia	++++ fort.te positiva

b) *Quantitativo*:

	Espécie de sôro	*Espec. da bact.*	*Quantidade Antígeno*	*Resultado*
	1) P. marsupialis +	P. marsupialis	0,025 cc.	++++ fort.te positiva
a) direta	2) P. intermedia +	P. intermedia	0,025 cc.	++ positiva
	3) P. avicida	P. avicida	0,025 cc.	++ positiva
	4) P. marsupialis +	P. avicida	0,1 5 cc.	++++ fracam.te posit.
	5) P. marsupialis +	P. avicida	0,025 cc.	0 (negativa)
	6) P. intermedia +	P. marsupialis	0,02 cc.	0 (negativa)
b) cruzada	7) P. intermedia +	P. intermedia	0,02 5 cc.	++ positiva
	8) P. avicida +	P. marsupialis	0,025 cc.	++++ fort.te positiva
	9) P. avicida +	P. intermedia	0,02 5 cc.	++++ fort.te positiva

As provas quantitativas orientam a separação das bactérias. A *Pasteurella marsupialis* e a *intermedia* têm certamente antígenos somáticos múltiplos e comuns, que explicam essas cofixações, sendo porém, maiores na *intermedia*. O antígeno da *P. avicida* é um poliedro bem mais complexo que o das duas primeiras.

O sôro do animal convalescente da moléstia provocada pela bactéria, não protege os animais sensíveis contra a mesma. Com o sôro do *rhesus* n.° 1, infectado e já convalescente, no 26.° dia da moléstia e que aglutinava a bactéria a 1 para 20.240, fizemos as seguintes provas:

COBAIOS 4.649 e 7.075 — Foram inoculados, via subcutânea, a 2 de março de 1943, com 5 cc. do sôro do *rhesus* n.º 1. No dia 3 de março de 1943 foram reinoculados, via intra-peritonial, com emulsão em sôro fisiológico da *Pasteurella intermedia* conservada, pelos replantios de laboratórios em agar-agar, durante 6 meses, *sem passagem por animal.*

Temperaturas do cobaio 4.649: 39,2/39,1/40,2/40,8/41, 2/41,0/40,8/41,0.

Sacrificado. Lesões típicas. Reinsulou-se a bactéria.

Temperaturas do cobaio 7.075: 39,0/39,22/40,5/41,0/40,8.

Os animais imunes ao virus do Tifo Exantemático Neotrópico no Brasil não o são para *Pasteurella intermedia.*

Exemplo:

COBAIO 4.875 —Inoculado com o virus VA_1.

Temperaturas: 38,8/39,5/39,2/38,8/39,2/39,0/39,2/39,2/.. 39,5/39,2/38,8/29,1/38,8/38,8. Alta. Ficou 7 dias em observação. Foi reinoculada com virus raça VB e observado durante 23 dias, sem que tivesse qualquer alteração térmica. Alta. Em observação durante mais 7 dias. Reinoculado, no fim dêsse tempo, com a *Pasteurella intermedia*, via intraperitonial, apresentou as temperaturas seguintes: 39,0/39,0 .. 39,0/40,0/41,2 morte. Reação testicular, esplenomegalia, congestão peritonial, renal, das cápsulas suprarrenais, etc. Reinsulou-se a bactéria.

ANATOMIA PATOLÓGICA

A *Pasteurella intermedia* provoca em animais sensíveis uma septicemia, com alterações principalmente congestivas em todos os órgãos e formação, não raro, de micro-abcessos. Não é exceção encontrarmos pequenas hemorragias nos parênquimas do baço, fígado, testículos, etc. O processo congestivo é encontrado, com certa acentuação, em todo o peritônio parietal e visceral, nos rins, nas cápsulas suprarenais, nas alças intestinais, etc. e em todo o sistema nervoso central. A esplenomegália é às vêzes, notável pelo tamanho do órgão, mas em todos os casos ela está presente. Os pulmões podem apresentar-se livres de qualquer modificação patológica ou demonstrar a presença de focos

congestivos. Os testículos, nos machos, apresentam-se volumosos, congestos, às vêzes edemaciados, com aderências da vaginal. Não há formação aparente de pus, mas pode haver placas de necrose no escroto. O exame microscópico dos órgãos confirma êsses achados da morfologia. O baço apresenta, além de uma constante periesplenite aguda (vide microfotografia n.º 8), uma ver-

Fig. 7
Fotomicrografia da *Pasteurella intermedia*. Aspecto clássico da Pasteurella. 2.000 aumentos.

dadeira esplenite, com congestão extensa e intensa do órgão, infiltração de polimorfo-nucleares e numerosas bactérias no parênquima esplênico. Tem-se a impressão, em alguns casos, de um infarte do baço. O fígado está sempre intensamente hiperemiado e pode apresentar, além de uma infiltração gral de polimorfos nucleares, verdadeiros micro-abcessos bem delimitados, com numerosas bactérias de permeio (vide microfotografias ns. 8, 9, e 10). Em muitos animais, há uma miocardite intersticial de foco. Os pulmões podem de-

monstrar um espessamento das trabéculas alveolares, com infiltrações delimitadas e às vêzes, edema. Os cortes dos testículos mostram os órgãos muito congestos e edemaciados. Não parece haver modificação na espermatogênese. Os canais do epididimo encontram-se cheios de espermatozóides perfeitos. Há

Fig. 8
Baço do cobaio n.º 7.997. 150 aumentos. Esplenite e periesplenite pela *Pasteurella intermedia*.

espessamento e infiltração da vaginal. Ela contém enorme quantidade de exudato fibrino purulento que invade também a parede do escroto (microfotografia n.º 11).

O exudato é formado, principalmente, de polimorfo nucleares, fibrina, células da serosa, abundantes bactérias com o característico morfológico de *Pasteurellas*, intra e extra-celulares, além de outros micróbios de infecção secundária e em menor número.

CHAVE PARA SEPARAR A PASTEURELLA INTERMEDIA

Quadro comparativo das germinações, fermentações e poder patogênico

ESPÉCIE DA BACTÉRIA	MOBILIDADE	INDOL	H²S	BILE	L. ARABINOSE	SALICILINA	D. SORBITOL	BATATA	MANITA	LEITE	GELATINA	GAMBÁ	COBAIO	AGLUTININAS	FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO
P. avicida	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	n. l.	0	+	A	+
P. Pestis	0	0	0	+	—	—	0	+	+	Acid.	n. l.	—	—	A	+
P. marsupialis	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+ Acid.	0	++	+++ Rt.	++++ A	++++ A
P. intermedia	++	0	+	+	n	0	+	0	+	Acid. Al.	+ n. l.	0	+++ Rt.	++++ A	++++ A
P. pseudo tuberculosis	+	0	+	—	+	+	+	+	+	Alc.	+	0	f. n.	+ A	+ A
P. bolligeri	0	+	+	0	0	?	+	—	—	0	—	—	?	+ A	+ A

CONVENÇÕES:

Al = alcaliniza
A = acidifica
A + Al = acidifica e alcaliniza posteriormente
R.t. = reação testicular
A + = fraca diluição
— A ++++ = forte diluição
0 = não prolifera ou não é patogenico
+ = fraco poder patogênico ou prolifera
++++ = forte poder patogênico
f.n. = formação de nódulos
n.l. = não liquefaz
+ n = prolifera e não altera o meio
? = ignorado.

De acôrdo com Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Fith Edition de 1939, o quadro para a classificação de Pasteurella intermedia, será o seguinte, com a nossa modificação:

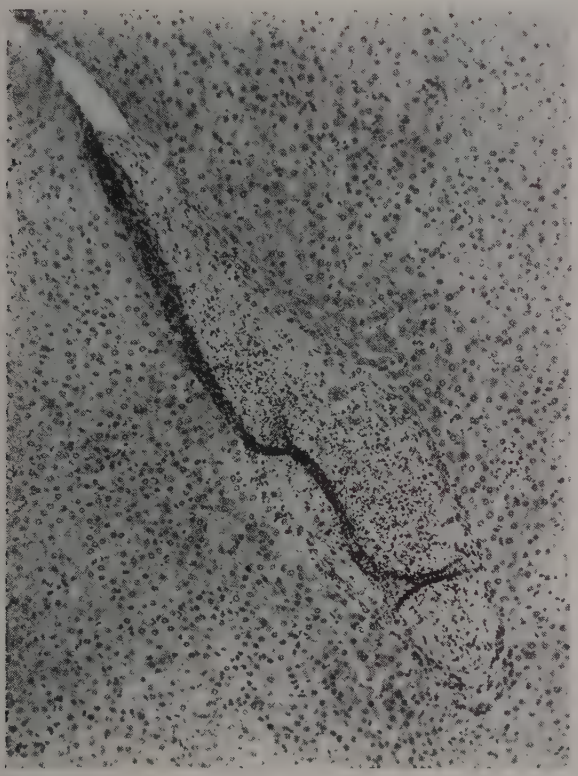


Fig. 9
Fígado do cobaio n.º 40. 150 aumentos Microabcesso epático.

II — GÊNERO DE PASTEURELLA

Cresce em meios ordinários, cresce no leite.

a) Imóveis, não flagelados a 18-26°. Não age ou acidifica ligeiramente o leite, sem produzir coágulos.

I — Produz H^2S e Indol — Não cresce em bile. Fermenta o Sorbitol. Tem fraco poder em formação de aglutininas.

Fig. 10
Fígado do cobaio n.º 7.997. 150 aumentos. Congestão e infiltração difusão do órgão.

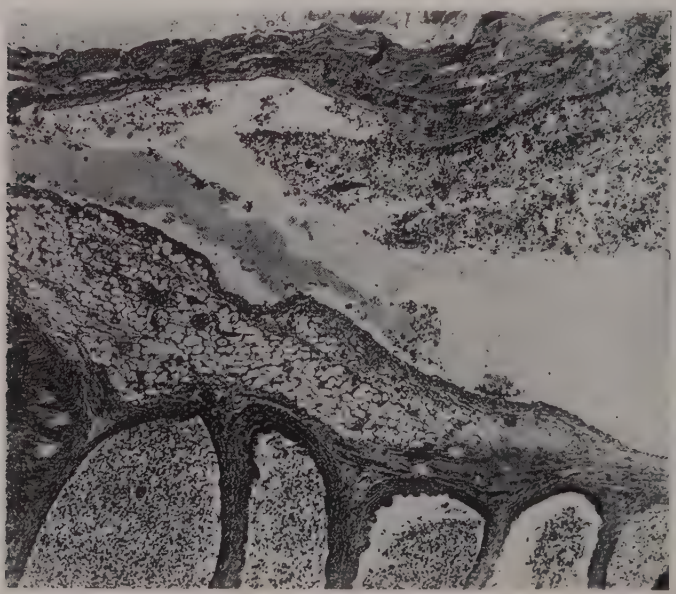


Fig. 11
Testículo de cobaio. Corte ao nível do epidídimo. Vêm-se os canais cheios de espermatozóides, as paredes espessadas da vaginal e o exudato ifbrino purulento no interior da serosa. No meio do exudato há abundantes formas de *Pasteurellas, intra* e extra celulares.

1) P. avicida
2) P. muricida
3) P. cuniculicida
4) P. suilla
5) P. bollingeri.

II — Produz Indol. Não produz H^2S. Cresce em bile. Fermenta o Sorbitol. Tem forte poder em formação de aglutininas.

6) P. marsupialis

III — Não produz Indol. Não produz H^2S. Cresce na bile. Não fermenta o Sorbitol. Tem fraco poder em formação de aglutininas.

7) P. pestis

B 1) Móveis. Flagelados ou não a 18-26°. Produz H^2S. Leite alcalino. Não produz Indol. Cresce na batata. Tem fraco poder em formação de aglutininas.

8) P. pseudo-tuberculosis.

B 2) Móveis. Não produz Indol. Acidifica e depois alcaliniza o leite. Fermenta o Sorbitol. Produz H^2S. Cresce na bile. Não cresce na batata. Tem forte poder em formação de aglutininas.

9) P. intermedia.

B 3) Não cresce em meios ordinários e não prolifera no leite.

10) P. tularensis.

HOSPITAL CÍCERO PEREIRA

29 de Setembro de 1941 — 16 horas.

Nome: M. L.

Branco, com 54 anos, brasileiro, vacinado.
Santa Casa (Clínica do prof. Balena).

Deu entrada neste hospital sem qualquer informação a respeito de sua doença.

Doente em estado pré-comatoso, extremidades cianozadas, discreta hiperestesia muscular, exantema petequial discreto (?), (como picada de pulgas) ao nível das espáduas, abdome e nádegas, língua larga e sêca, com grossa

camada de saburra branca. Abdome deprimido, flácido, fígado e baço não palpáveis, bulhas cardíacas abafadas; pulso fino, rápido, abundantes estertores de bronquite em ambos os hemitorax.

Temperatura: 39. *Pulso*: 120'.
Diagnóstico: Caso suspeito de Tifo Exantemático.

NECROPSIA DE M. L.

2 de outubro de 1941.

Morte à 1 hora da manhã. Necrópsia a 1 1/2 da tarde.

HÁBITO EXTERNO

Cadáver de adulto do sexo masculino, em completa rigidez cadavérica, de côr branca, em regular estado de nutrição. Cabelos e barba grisalhos. Córneas opacificadas e pupilas igualmente dilatadas. Dentes em péssimo estado de conservação. Pescoço não deformado. Abdome com cicatriz umbilical deformada e ligeiramente abaúlado. Livores cadavéricos nas regiões em declive. Não se observa exantema. Pelas cavidades naturais nada saía.

HÁBITO INTERNO

Cabeça — Retalhos do couro cabeludo e abóbada craneana sem coisa digna de nota. Dura-mater aderente à calote. Seio longitudinal superior contendo coágulos cruóricos. Seios da base do crâneo contendo coágulos cruóricos. Vêm-se as meníngeas moles do hemisfério esquerdo e próximo à cisura inter-hemisférica, pequenas granulações brancacentas, ao nível do lóbulo parietal. Aos córtes nada foi possível apreciar. No hemisfério direito, ao nível também do lóbulo parietal, se viam granulações semelhantes, em número muito menor. Consistência geral: diminuída. Pêso do encéfalo: 1.190 grs.

INCISÃO MENTO-PUBIANA

Panículo adiposo subcutâneo regularmente desenvolvido. Músculos com côr vermelha e com brilho diminuido. Alças intestinais destendidas pelos gases. O fígado não excede o rebordo costal. Levantando o plastrão costal, vê-se descoberta a área cardíaca. Saco pericárdico contendo cêrca de 5 cc. de líquido amarelo citrino, sem grumos. Aderência pleurais à direita e à esquerda.

LÍNGUA E ÓRGÃOS DO PESCOÇO

Língua saburrosa. Amigdalas ligeiramente salientes, dando saída, pela expressão, à massa brancacenta. Mucosa do esôfago pálida. Traquéia e grossos brônquios contendo pequena quantidade de catarro. Mucosa pálida.

Tiróide: não aumentada. Ao corte, de côr marron.

Pulmão direito, com 840 grs. Pleura com vestígios de aderência. Pela palpação, notam-se zonas endurecidas ao nível do ápice e todo bordo posterior. Aos córtes, viam-se nestas zonas: vastas áreas de côr vermelho carregado, apresentando-se em tôrno do pequeno brônquio, de onde escoava catarro. Estas áreas alternam-se com outras, de côr vermelho vivo.

Pulmão esquerdo: com[a] 770 grs. Pleura com vestígios de aderência. Pela palpação, sente-se todo o bordo posterior endurecido. Superfície de córte com aspecto semelhante ao do direito.

Coração: com 280 grs. Endocárdio fino e liso. Miocárdio de côr vermelha. Espessura na base do ventrículo esquerdo: 1,3 e no direito 1,5 cms. Nada de particular se nota ao nível dos orifícios valvulares. Pericárdio com pequena sobrecarga de gordura. Túnica interna das coronárias com placas amareladas, ligeiramente salientes. Paredes das artérias bastante endurecidas. Túnica interna da aorta com numerosas placas amareladas, ligeiramente salientes.

Fígado: Pesando 1k,480 e medindo 26,5 x 19 x 9 cms. Cápsula com vestígio de aderência com o diafragma. Aos córtes, é de côr marron e apresenta área que lembram o aspecto da noz-moscada. Vesícula biliar contém líquido amarelo-esverdeado. Paredes delgadas.

Baço: Pesando 160 grs. e medindo 10,5 x 8 x 4 cms. Cápsula aderente à parede e destacada com alguma polpa. Superf?cie de corte de côr vermelha vinhosa, deixando ver traves brancacentas, em delicado pontilhado branco. À raspagem destaca escassa quantidade de polpa.

Rim direito: Medindo 11 x 6,5 x 3,5 cms. e pesando 140 grs. Fàcilmente decorticável. Na face anterior, se vêm pequenas cicatrizes deformadas. Ao córte, distingue-se bem a medular da cortical. Cortical rósea avermelhada e medular rosa-avermelhado. Mucosa do cálice e bacinete lisa e brancacenta.

Rim esquerdo: Medindo 11 x 8 x 3,5 cms. e pesando 150 grs. Decorticação fácil. Aspecto semelhante ao do rim direito. Mucosa da bexiga de côr branca amarelada.

Supra-renais: Direita medindo 5,5 x 2,7 x 1 cms. Esquerda medindo 5 x 7,2 x 1. Aspecto interior e exterior nada digno de nota, distinguindo-se bem medular da cortical. Consistência amolecida.

Estômago e intestinos: Nada digno de nota.

Diagnóstico anátomo-patológico: Bronco-pneumonia. O exame histopatológico comprovou os dados da morfologia. Nos preparados foram vistas bactérias, com a morfologia das *Pasteurellas,* principalmente nos focos de bronco-pneumonia.

Agradecemos à Sta. Conceição Fernandes as fotomicrografias que ilustram o presente trabalho.

RESUMO

Os autores descreveram uma nova bactéria — *Pasteurella intermedia* n. sp., obtida pela inoculação em cobaio de 2 cc. de sangue total de um indivíduo morto de bronco-pneumonia e suspeito de ter a forma grave de Tifo exantemático neotrópico.

Têm a impressão que a *Pasteurella marsupialis* e a *P. intermedia,* constituem um grupo à parte, bem definido, dentro das *Pasteurellas*. Muito pequenas, de grande e persistente poder patogênico para os animais comuns de laboratório, mesmo quando as amostras das bactérias são conservadas pelos replantios em agar-comum, na temperatura e iluminação comum em laboratórios, durante anos. Estas duas *Pasteurellas,* ao contrário das demais, têm o alto e inconfundível poder antígenico, para a formação de aglutininas e fixação do complemento e dão com constância uma "reação testicular" em cobaios machos, quando injetadas pela via intra-peritonial, febre alta, esplenomegalia constante e às vêzes notável, prestando-se à confusão para o diagnóstico diferencial e experimental com a raça VB do Tifo exantemático neotrófico no Brasil (Moléstia de Pisa, Gomes e Mayer).

SYNOPSIS

The authors have described a new bacterium — Pasteurella intermedia, n. sp. obtained by inoculating a guinea-pig with 2 cc. of total blood from an individual who died from bronco-pneumonia and suspected of having a seriou form of neotropic exanthematic Typhus.

They have the impression that Pasteurella marsupialis and Pasteurella intermedia constitute a distinct and well-defined group among the Pasteurellas. Very small, having a great and persistent pathogenic power over the usual laboratory animals, even when the specimens of the bacteria are preserved for years by replanting in common agar in the common temperature and illumina-

tions of the laboratory. These two Pasteurellas, contrary to the others, have a great and unmistakable antigenic power for the formation of agglutinins and fixing of the complement and constantly give a testicular reaction in male guinea-pigs when the injection is intraperitonal, high fever, constant and sometimes notable esplenomigalia causing confusion for an expermental and differential diagnosis with the VB race of neotropic exanthematic Typhus in Brasil (Disease of Pisa, Gomes and Mayer).

BIBLIOGRAFIA

Badger, L. F.

1933. The laboratory diagnosis of endemic typhus and ROCKY MOUNTAIN SPOTTED FEVER with special reference to cross-immunity test. — The Amer. J. Trop. Med. 13: (2) 179/190.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

1939. By David H. Bergey, Robert S. Breed, E. G. D. Jurray, A. Parker Hitchens. Fith Edition, The Williams & Wilkins Company.

Bier, Otto

1942. Bacteriologia e Imunologia em suas aplicações à Medicina e Higiene. Comp. Melhoramentos de S. Paulo.

Braga, Américo

1940-42. Sôros, vacinas, alergenos e imunigenos. — 3 volumes. Imp. Nac. Graáfica Guarany. R. Henrique Valadares, 145, Rio de Janeiro.

Cruz, Oswaldo Gonçalves

1906. Peste — Trabalho do Instituto Manguinhos. Tipograf. Bernard Frères, Rua do Hospício, 138, Rio de Janeiro.

Fernandes, M. C.

1944. Métodos escolhidos de técnica microscópica. — Imprensa Nacional. Rio de Janeiro.

Horta, Paulo de F. Parreiras

Contribuição ao estudo das septicemias hemorrágicas. — Trabalho do Inst. de Manguinhos, Rio de Janeiro, 1904.

Hutyra, F. Prof., Dr.

Septicemia haemorragica. — Handbuch der Pathog. Mikroorganismen. Band VI, pgs. 64/95. 1912. 2 Auflage Jena. Verlag von Gustave Fischer.

Jordan, Edwin O.

"A text-book of general Bacteriology". — W. B. Saunders Company, 1936. Philadelphi — London.

JORDAN, Edwin O., and BURROWS, Willian

"A text-book of General Bacteriology". — Thirteenth edition. Revise. W. B. Saunders Company, 1936. Philadelph-London.

KEMP, Hardy A.

Typhus fever: Some notes on the cultivation of the virus and on active immunity. — The Amer. J. Trop. Med. 13:(2):191/200:1933.

LÉVY-BRUHL, M.

Les pasteurelloses humaines. — Annales de Medicine, 44:(5)406/437:1938.

LACORTE, J. G.

Bacteriologia e Imunologia. — 2.ª edição — 1936. Editores Flores e Mano, Rio de Janeiro.

MACCHIAVELLO, Atilio, dr.

El Tifo exantematico en el Ecuador — Revista Ecuatoriana de Higiene y Medicina Tropical. Año (vol.) 1, n.º 1. Enero 1944. Guayaquil — Ecuador:

I — Estudio experimental de cepas aisladas en el Ecuador Iterandino — pgs. 3/16
II — Sobre supuesto casos de Tifo exantematico en Guayaquil — pgs. 17/26.
III — Investigaciones sobre la existencia de Tifo murino en Guayaquil — pgs. 27/32.

MAGALHÃES, Octávio de, e ARAUJO, Paulo

A Peste em Pelotas. — Off. Typog. do "Diário Popular". Pelotas, 1921.

MAGALHÃES, Octávio de

A peste dos polmões. — Mem. do Inst. Osvaldo Cruz. Tomo 21, fasc. 11, páginas 373/380, com 6 estamp. 1928.

MAGALHÃES, Octávio de

A Peste dos polmões. — Mem. do Inst. Osvaldo Cruz. Tomo 25, fasc. IV, páginas 317/321, com 6 estamp. Nov. 1931.

MAGALHÃES, Octávio de, e ROCHA, Adyr

Contribuição ao conhecimento das Pasteurellas dos animais. Pasteurella marsupialis n. sp. — Sep. das Memórias do Inst. B. Ezeq. Dias, anos 1939-1940. Tomos ns. 3 e 4, pgs. 1/19, com 5 estampas.

MAGALHÃES, Octávio de, e ROCHA, Adyr

Raças do tifo exantemático neotrópico no Brasil. — Rev. Brasil. Biol., 3:(1):68/82: Março 1943.

MONOGRAPHS of Systematic Bacteriology

General Sistematique Bacteriology. — Baltimore. Willian Wood and Company, 1925.

MORCH, J. R., KROGH-LUD, G.

Rechèrches sur les bacteries du groupe Pasteurella. — C. R. Soc. Biol. T. 105, 1930 (pp. 319/322).

PACHECO, Genesio, e ARTIGAS, Paulo

Afeções supurativas e mutilantes da nutria ou ratão do banhado. — Uma nova espécie de Pasteurella — P. Myocastori. — Rev. da Soc. de Med. Veterinária, volume II, ns. 2-3, Julho-Dezembro de 1932. São Paulo.

PELTIER, U. Arquie., E. JONCHÈRE H., et LE BLOUCH

Septicémie mortelle à Pasteurella. — Bull. Soc. Path. Exot. T. 31, pgs. 475/478, 8 Juin 1938.

PESTANA, Bruno Rangel, ARANTES, Maria, e RUGAI, Ettore

Pasteurelose humana. — Rev. do Inst. Adolfo Lutz 1:(2):357/360:1941.

PESTANA, Bruno Rangel, e RUGAI, Ettore

Contribuição ao estudo das Pasteurellas. — Rev. do Inst. Adolpho Lutz. Vol. 3, n. 1, pgs. 59/74, Agôsto de 1943.

PETZEKATIS

L'urétrite à Pasteurella. — J. d'Urol. T. 26, pp. 434/436, 1928.

RICE, Thurman B.

A Text-book of Bacteriology. — 1936. W. B. Saunders Company, Philadelph and London.

SCHÜTZE, Harry

M. B. B. S. Melb M. D. Würz — The paratyphoide — B. — Group. — The Lancet. Vol. 198, pgs. 93/97, 1920.

SILVA JUNIOR, Macello, dr.

Sôbre la Peste en el Nordeste Brasileño — "Separata" do Brasil-Médico. Ano LVII, n.º de Fevereiro, 1 vol., pgs. 3/64, Sodré & Cia., Junho 1943, Rio de Janeiro.

SILVA JUNIOR, Macello, dr.

Conclusões finais de 3 anos de estudos em torno do problema da peste no nordeste. — Separata do Boletim de Higiene e Saúde Pública, Dezembro 1943, pgs. 1/25, com 11 estampas.

SILVA JUNIOR, Macello, dr.

Peste Bubônica. — 1 vol. 375, pgs. (inédito). Rio, 1944.

SMILLIE, W. G.

Bacilos semelhantes ao da peste, encontrados nos ratos da cidade de São Paulo, — Bol. da Soc. de Med. e Cirurgia de S. Paulo, vol. 3 (3.ª série) n.º 4, páginas 134/139, 1920.

TEISSER (B.), CASTINEL (P.), REILLY (J.), RIVALIER (E.).

Contribution à l'étude des pasteureloses. Apropos d'un cas de pasteurellose humaine. Étude clinique et expérimentale. — J. de Phys. et path. génér., t. 20, pgs. 212/225, 241/236, 1922.

TOPLEY, W. W. C., and WILSON, G. S.

The Principles of Bacteriology and Imunity. — Baltimore Willian Wood and Company, 1937.

WALKER. E. L., and SWEENEY, Ma. A.

Some infections simulanting experimental thyphus in the guinea-pig. — The Amer. J. Trop. Med. 12:(3):217/222:1932.

WEBSTER, Leslie T.

The rôle of microbic virulence, dosage and host-resistence in determining the spread of bacterial infections among mice (Pasteurella lepiseptica and Pasteurella aviseptica infections). — The J. Exp. Med., vol. 52, pgs. 901/908, 1930.

ZINSSER, L. Hans, and JONES, Stanhope Bayne

A text-book of general Bacteriology. — Eight Edition, Revised and Reselt. D. Appleton Century Company. New York-London, 1939.

Nota sôbre a infestação de Musca domestica Linneu, 1758 por um Ficomiceto do gênero Empusa (*)

por

Jonio F. de Salles e Charles R. Hathaway

(Com 4 figuras no texto)

Tivemos por varias vêzes oportunidade de capturar alguns exemplares de moscas, via de regra coladas pela proboscida a objetos onde existia sempre deposição de material fecal.

As moscas achavam-se de tal maneira seguras que, ao retira-las, sem exceção, perderam a proboscida.

Apresentavam as moscas o abdome desenvolvido, visìvelmente turgido, brilhante, deixando ver na parte ventral uma tonalidade esbranquiçada, assim como nas asas e nas porções terminais das pernas posteriores, como também na região em que o abdome se encosta ao suporte, onde podemos evidenciar, recobrindo-as, uma substância finamente granulosa, lembrando pó de arroz.

O entumescimento acentuado do abdome dura em média 24 horas, período em que, evidentemente, o parasita provoca a destruição dos órgãos abdominais da mosca, ocasionando desta forma, a morte do inseto.

Um prenúncio, interessante, aliás, da doença nas citadas moscas, consiste no fato de quando atacadas ficam mansas e começam a nos perseguir, dando ensejo a que sejam eliminadas com certa facilidade.

Outra característica interessante da *Empusa muscae* é a sua acentuada preferência não só pelo tempo frio como pelo maior teor de umidade, fato êste que por varias vêzes observamos.

Tanto assim é que em outros períodos do ano, examinando grande número de moscas apanhadas em várias localidades, nunca nos foi possível constatar tal fato, daí crermos, que para um perfeito desenvolvimento desta espécie de cogumelo, as condições ideais de vida sejam o frio-úmido.

* Recebido para publicação a 6 de julho e dado à publicidade em agôsto de 1944.

De há muito que se procura cultivar artificialmente a *Empusa muscae*, o que aliás não se consegue com facilidade, porque êste cogumelo se desenvolve bem sòmente nos organismos por êle parasitados, enquanto a maioria de outros cogumelos encontram perfeitas condições de vida nos vários meios artificiais.

Fig. 1 — Vê-se nitidamente a infestação da mosca pelo cogumelo, principalmente na perna posterior esquerda e na face inferior da asa. (Foto *J. Pinto*).

No que concerne a êste fato, chamamos a atenção para a sua grande importância na profilaxia dos insetos pelo combate biológico, o que aliás assinala Bernstein (1910).

O cogumelo causador desta doença nas moscas, *Empusa muscae* Cohn, 1855, tem as seguintes características:

> Micélio bem desenvolvido, tabulado ou filamentoso, raramente septado, com conteúdo gorduroso e formando conidioforos, que descarregam os conídios violentamente. Conídios grandes, pouco corados e as vêzes multinucleares. Conidioforos clavados. Unicelulares. Zigosporos globosos, nus.

A fim de ser feito estudo histológico, incluímos, cortamos e coramos alguns exemplares de moscas contaminadas, tendo o exame microscópico nos reve-

lado a existência de abundante micélio ocupando tôda a cavidade abdominal, onde não se consegue distinguir a estrutura normal.

Vê-se, com maior aumento, nìtidamente, a morfologia do cogumelo, constituído por hifas raramente septadas, formando pequenas células, cilíndricas ou ligeiramente arredondadas, na maioria das vêzes com um só núcleo. Estas células estão quase sempre dispostas em cadeia, porém, não raro, são vistas células inteiramente isoladas.

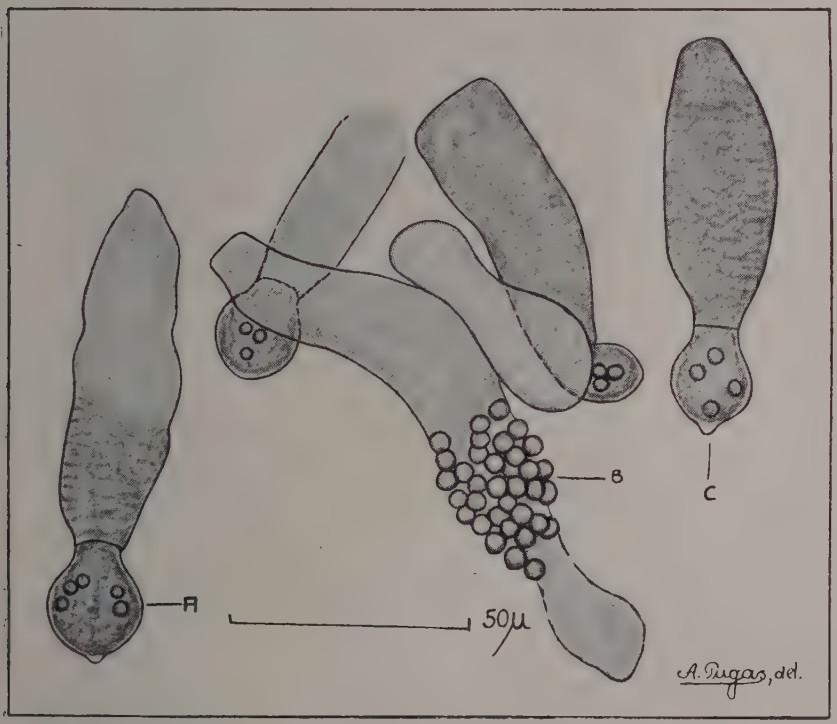


Fig. 2 — Desenho de um preparado a fresco, obtido por expressão de uma mosca contaminada. Nota-se micélio bem desenvolvido, formando em sua extremidade conidioforos (A), que descarregam os conídios (B) violentamente. São vistos também conídios grandes, pouco corados e as vêzes multinucleados. Via de regra os conidioforos se apresentam em forma de clava (C).

Consultando a literatura inerente às infestações de moscas por parasitos, verificamos que Bernstein (1910) foi o primeiro que assinalou êste parasitismo, afirmando na mesma ocasião, que o cultivo artificial de *Empusa muscae*, se possível de obter, seria de grande utilidade na profilaxia das moscas.

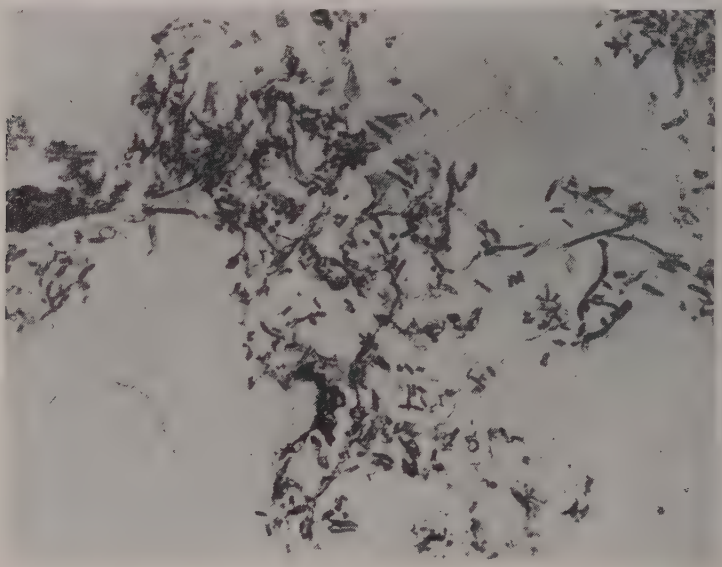


Fig. 3 — Col. Hematoxilina-eosina 90 X. Córte histológico, onde se vê os cogumelos ocupando tôda a cavidade abdominal de uma mosca infestada.
(Foto *J. Pinto*).

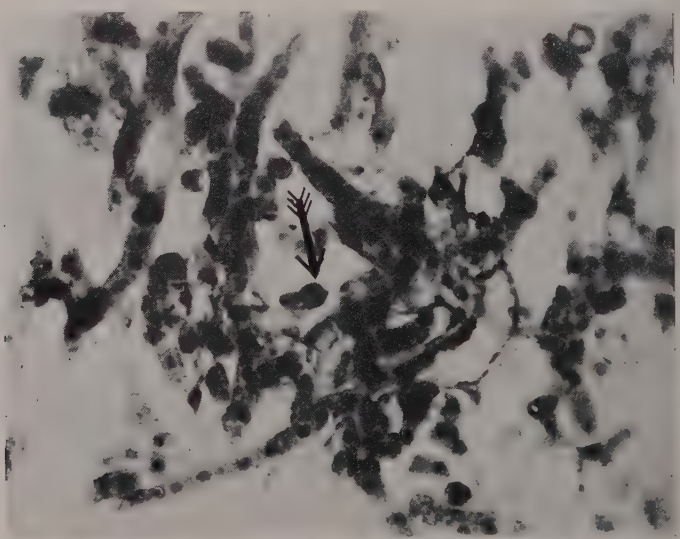


Fig. 4 — Hematoxilina-eosina 450 X. Nota-se o micélio bem desenvolvido, septado ou não e alguns conidioforos contendo conídios.
(Foto *J. Pinto*).

Picard (Paillot, 1913), em seu trabalho (*Les Champignons parasites des insectes*), atribui a Hesse a prioridade na obtenção dessa cultura artificial.

Êste autor aliás, em trabalho aparecido no (*The English Mecanic and world of science*, 1912), assinala a contaminação experimental de *Empusa muscae* por intermédio de alimentos em *Musca domestica*, *Faunia canicularis* e *Stomoxys calcitrans*.

Além de Hesse, R. Morgan (1912), trabalhando no Instituto Lister, Elstree, obteve também com relativo sucesso a cultura dêste cogumelo.

Paillot (1913), em seu trabalho pormenorizado sôbre os microorganismos parasitos de insetos, falando a respeito de infestação de *Musca domestica*, por *Empusa muscae*, teve ocasião de frisar que esta infestação se produz de uma maneira mais ou menos regular, quando as moscas se alimentam de água açucarada contaminada com esporos.

— Consignamos aqui os nossos sinceros agradecimentos ao Prof. A. E. Arêa Leão, que, além de identificar o cogumelo, foi o orientador dêste trabalho.

SUMMARY

The authors give biological data and a histological study of infestation of *Musca domestica* Linneu, 1758 by a Phycomycetes of the genus *Empusa*.

BIBLIOGRAFIA

Hesse

1913. A parasitic mould of the house-fly.
British Med. Jour., 1 : 41-42.

Paillot, A.

1913. Les microorganismes parasites des insectes.
Leur emploi en Agriculture.
Ann. Serv. Épiphyt., 2 : 188-232, 12 figs.

Endocardites sépticas

(Contribuição etiopatogênica)

por

J. Guilherme Lacorte e Mario Santos

(Com 40 figuras no texto)

Considerações gerais

O estudo bacteriológico das endocardites adquiriu extraordinária importância desde o momento em que Schottmueller descreveu, como agente etiológico da forma lenta, o *Streptococcus viridans*, assim como emprestou à doença o caráter de entidade mórbida autônoma. Antes dêsses trabalhos, realmente fundamentais e cuja crítica será feita oportunamente, já inúmeros pesquisadores se dedicaram ao assunto considerado do maior interêsse médico.

A observação microscópica de material retirado das lesões é bem antiga. Assim, em 1862, Lanceraux verificou, em ulceração do endocárdio, a presença de elementos alongados, granulosos, que é possível interpretar-se como sendo qualquer espécie bacteriana. Winge, em 1869, descreveu cadeias de microorganismos em esfregaços, tanto de lesões do endocárdio como de infartos do baço e rins, e Heiberg, em 1873, fêz idênticas verificações, interpretando o que observara como formas de cogumelos. Foi Klebs que, em 1875-1878, concluiu pela existência de dois tipos de endocardite, ambas parasitárias segundo a sua opinião, as reumáticas e as sépticas. Em casos semelhantes, as primeiras hemoculturas positivas foram obtidas por Jaccoud e Grancher. Observação mais completa foi feita, em 1886, por Netter. Em caso de endocardite, pneumocócica isolou o germe do sangue e do escarro, durante a vida do doente, e das lesões valvulares, *postmortem*. Prosseguindo nas suas experiências obteve a doença experimental em coelhos. Todos êsses casos correspondiam ao tipo agudo, de evolução rápida, de Senhouse Kirkes. Só posteriormente Jaccoud, Osler e Schottmueller, em diferentes datas, insistiram sôbre o tipo de evolução lenta e Libman, depois, sôbre o tipo subagudo.

---

* Recebido para publicação a 6 de julho e dado à publicidade em agôsto de 1944.

No período que vai desde os trabalhos básicos de Bouillaud até os de Jaccoud, coincidindo com a era pré-bacteriológica, já inúmeros autores enfrentaram o problema, conforme referimos. Não puderam, todavia, pela falta de recursos técnicos atingir o ponto a que chegaram os pesquisadores que retomaram a questão a partir dos trabalhos de Jaccoud e de Osler. Foi, portanto, nesta última fase, que os estudos se intensificaram nesse sentido.

Admitiram-se dois tipos perfeitamente distintos de endocardite, denominada maligna : a de evolução aguda de Senhouse Kirkes e a de evolução lenta de Jaccoud-Osler. No primeiro caso, uma septicemia, tendo como origem uma infecção assestada em qualquer ponto do organismo, localizar-se-ia também no endocárdio prèviamente lesado ou não. No segundo caso, a evolução seria lenta e as alterações do endocárdio chamariam logo a atenção e governariam tôdas as manifestações do processo.

Depois da era bacteriológica, os autores que se dedicaram ao assunto isolaram, quer pela hemocultura, quer pela semeadura de material colhido do cadáver, das lesões endocárdicas e infartos, germes das mais variadas espécies, podendo-se estabelecer que qualquer microorganismo capaz de provocar septicemias ou bacteriemias pode localizar-se no endocárdio. Para as febres tifóide e paratifóides, cujos casos dessa natureza deviam ser abundantes, parece que se constituiu uma exceção. Apesar disso, têm-se assinalado alguns. T. Thayer cita 3 em 132 mortos de 1458 doentes. Deve-se referir que dêsses três casos isolou-se também o estreptococo. Carles e Marcland apresentam um caso de febre paratifóide B dentre 160 doentes. Para Perry foram incompletas as provas bacteriológicas executadas.

Quando Schottmueller apresentou as suas observações e considerou a endocardite lenta como doença autônoma provocada por germe específico — o estreptococo que enverdece os meios com sangue e tem pouca virulência para os animais de laboratório — obteve o apoio de grande número de pesquisadores e clínicos. Entre nós êsse germe foi isolado, em primeiros trabalhos, por C. Lima, em 1929.

As críticas ao que estabelecera Schottmueller não tardaram a aparecer e foram encaminhadas a diversos pontos da questão.

Relembremos os trabalhos dêsse autor. Em 1903, descreveu as espécies de estreptococos às quais designou *Streptococcus haemolyticus, Streptococcus viridans* e *Streptococcus anhaemolyticus*.

Baseou-se para fazer a sua classificação na propriedade que os germes apresentam conforme a atuação que exercem sôbre a hemoglobina empregada nos meios de cultura. Os da espécie *viridans* são constituídos por pequenos cocos em cadeias, muitas vêzes dispostos aos pares. Crescimento demorado e

proliferação escassa nos meios de cultura, principalmente sólidos; turvam o caldo com depósito pulverulento e coagulam o leite. As colônias, nas placas de ágar sangue, são pequenas e de coloração esverdeada, donde o nome da espécie. Germe de vitalidade fraca e sem virulência para os animais de laboratório. Foi a êsse microorganismo que Schottmueller atribuiu, em 1910, papel etiológico específico na endocardite lenta. Para êsse autor e sua escola essa propriedade biológica é estável e de modo absoluto diferente da que apresenta o *Streptococcus haemolyticus*. No entanto, nem sempre é fácil a apreciação do poder enverdecente do germe. Schottmueller considera característica a coloração que adquire a própria colônia. Morgenroth, Biberstein, Schnitzer e Munter não dão importância senão ao halo verde que cerca a mesma. Além disso, a ação exercida pelo germe não é contínua. O halo verde é típico depois de 24 a 30 horas. Depois de 40 horas aparece halo de hemólise, muito leve, circunscrevendo o anterior. Êste último é mais evidente quando se coloca a cultura em baixa temperatura ou, então, durante alguns dias no ambiente do laboratório. Se se coloca a 37° notar-se-á novo halo de hemólise circunscrevendo os anteriores. Essa formação de halos sucessivos só se observa com o *Streptococcus viridans*. Schottmueller verificou ainda a diferença de ação bactericida do sôro normal sôbre amostras de *S. viridans* e *S. haemolyticus*. Outros autores trataram de obter novos caracteres distintivos. Billings verificou que, sôbre gelose sangue chocolate, as colônias do *S. haemolyticus* são cinzentas, ao passo que as do *S. viridans* e também as do pneumococo são verde-amareladas.

Sôbre gelose contendo 1% de glicose e 1% de metaemoglobina quìmicamente para o *S. viridans* e o pneumococo dão colônias cinzentas e esverdeadas já depois de 12 horas ao passo que o *S. haemolyticus* dá colônias cinzentas. Major e Marchal relatam bons resultados empregando a reação de fixação do complemento como meio diferencial. Krigler recorreu à sôroaglutinação por meio de sôros preparados com amostra típica de *S. haemolyticus*. Verificou reações positivas em cêrca de 30% dos casos e sempre negativa com o *S. viridans*. Kreidler, Kinsella e Wright empregaram reações imunológicas.

Em trabalhos posteriores Schottmueller manteve as suas idéias, sempre acompanhado por inúmeros adeptos. Lehman, em 1926, chegou a opinar no sentido de se diagnosticar endocardite lenta sòmente os casos cuja evolução clínica coincida com o isolamento do *S. viridans*. Kreidler, partidário das mesmas idéias, obteve, em coelhos, lesões experimentais idênticas às que se encontram no homem. Jurukoff, em 1931, estudou nove casos e chegou às mesmas conclusões.

Passaremos agora aos opositores das idéias de Schottmueller e sua escolia. devemos encarar, em primeiro lugar, a questão da especificidade bacteriana referente aos estreptococos. Para vários autores, principalmente franceses, trata-se de uma única espécie. Manifestaram êsse modo de pensar Marmorek, Besredka e outros.

As condições em que se encontra o germe são responsáveis pelas propriedades aparentemente diversas que manifesta. Além dos autores acima citados Kermongant e outros tiveram ocasião de estudar as variações que podem ocorrer entre os estrepctococos e os pneumococos.

A possibilidade de mutação do *S. haemolyticus* em *S. viridans* foi primeiramente verificada por Babcok e depois por Pezzi e Derlich, pela injeção em animais. Admitem que a variação seja uma conseqüência da diminuição de virulência do germe.

Rosenow, em meio de concentração salina variável e pH ácido, transformou 21 amostras de *S. haemolyticus* em *S. viridans*. Conseguiu, em seguida, transforma 17 amostras dêste em pneumococo. Pela passagem em camondongos Kuczinski e Wolff, Schnitzer e Munter conseguiram transformações da mesma natureza. Kermongant também o conseguiu empregando meios com sangue e Todd submetendo o *S. haemolyticus* a anaerobiose e passagem por animais. Lesbre conseguiu o contrário, isto é, transformar o *S. viridans* em *S. haemolyticus* semeando aquêle em pus tindalizado e Bier verificou idêntica transformação empregando o bacteriófago específico.

As reservas opostas a essas experiências foram desfeitas por Schnitzer e outros que conseguiram repetí-las e, mais, segundo referiram, transformar o pneumococo em *S. haemolyticus* cultivando aquêle germe em meio de lêvedo e carvão adicionado de optoquina. Por injeção em camondongos foi o mesmo de novo transformado em pneumococo, mas de tipo diferente do primeiro.

Principalmente depois dessas verificações sofreu a doutrina de Schottmueller sérios abalos passando muitos autores a admitir a possibilidade do estreptococo apresentar, conforme o ambiente em que se encontra, ou a influência que sofreu, o caráter hemolítico, enverdecente ou inerte. O *S. viridans* representará um estádio na evolução do estreptococo. Assim pensam, entre outros, Achard, Laubry e Marchal. O nome *mitior*, dado por Libman, é significativo. Para Ceresoli êle representa o ponto de passagens entre o hemolítico e o inerte.

Segundo um grupo de autores, as mutações dependeriam das variações de imunidade do organismo infetado. O isolamento do *S. viridans* de casos agudos e *S. haemolyticus* dos de evolução prolongada não fala muito em

favor dessa hipótese, segundo Jouve. E' possível, no entanto, que a menor resistência do organismo permita ao *S. viridans* ocasionar a forma aguda da endocardite.

Se, pela hemocultura, isolamos o *S. anhaemolyticus* ou um estreptococo anaeróbio (*Veillonella*), será difícil descobrir sinais clínicos, por menores que sejam, capazes de permitir diferenciação da endocardite lenta descrita por Osler. Alguns autores insistem, no entanto, sôbre pequenos detalhes. Jouve aconselha rever a questão dos infartos microscópicos, reações endotelias e retículo-histiocitárias. Held, Goldbloon e Bingold acreditam que a reunião dêsses dados esparsos possa dar a diferença existente entre êsses tipos de endocardite.

Comprovada pela observação prevalece a idéia de que qualquer germe poderá ocasionar a endocardite lenta. O isolamento das mais diversas bacterias de casos indubitáveis da doença forçou essa nova concepção etiológica contrária â que divulgou Schottmueller. O próprio *S. haemolyticus* está nesse número e, o que é mais extraordinário, as hemoculturas repetidas dos mesmos casos têm revelado, a alguns autores, ora o *S. viridans* ora o *S. haemolyticus* ou até o pneumococo, dando a impressão de mutações ocasionadas no decorrer da doença. Pela observação de amostras que temos isolado em nosso laboratório verificamos, com freqüência, a passagem do *S. haemolyticus* em *S. viridans* sem maiores artifícios. Basta que as culturas envelheçam.

Além dessas importantes observações, Sachs e Baehr e depois Libman descreveram, em 1923, processo endocárdico especial ocasionado por agente microbiano. O quadro clínico caracteriza-se pela evolução lenta, febril, resultando quase sempre negativas as hemoculturas, lesões faciais de lupo edematoso, numerosas petéquias e terminação por caquexia progressiva. Ausência de quaisquer microorganismos, mesmo em pesquisa *post-mortem*. O exame necroscopico revela uma associação de endocardite verrucosa e glomérulo nefrite. Mas o que há de mais notável é a existência de proliferações endoteliais particulares nas arteríolas dos rins, coração, fígado, sem nódulos de Aschoff no miocárdio. Poder-se-ão admitir casos puramente tóxicos de endocardite? Willer refere um de eclampsia, mas Jouve acha que a pesquisa bacteriana foi insuficiente em tal caso. Vecchi, no entanto, obteve lesões experimentais à custa de simples toxinas bacterianas. As alterações dos pequenos vasos podem ser atribuídas a processos tóxicos e também a reação hiperérgica.

Outro tipo interessante de endocardite mereceu descrição original de Magarinos Tôrres que o designou "endocarditis muralis", em vista da loca-

lização do processo na parede do endocárdio e não nas válvulas, pelo menos originàriamente. Os casos referidos tiveram evolução prolongada, pequena elevação térmica, podendo ter os trombos iniciais uma extensão considerável e, conforme assevera êsse pesquisador, o quadro anátomo-patológico é constante, a sintomatologia uniforme, assim como são importantes as lesões viscerais (infartos) diretamente dependentes do processo. Segundo Tôrres, não resta dúvida sôbre a origem bacteriana do mesmo.

Em que condições e como se dará a localização do estreptococo ou outro germe para produzir a endocardite? Para Clawson e Bell é ela uma seqüência da reumática, sendo ambas fases da mesma doença. Von Glahn e Pappenheimer asseveram que a endocardite bacteriana sempre se observa em lesões reumáticas relativamente recentes e não sôbre as mesmas já curadas ou antigas. Held e Lieberson contestam apresentando o grande número de bactérias que se têm isolado dos casos de endocardite sem relação com o reumatismo. Também sabemos que, em muitos casos, as lesões reumáticas (nódulos de Aschoff) são inexistentes. Para aquêles autores a relação imediata entre lesões reumáticas e endocardite bacteriana é a exceção e não a regra.

De qualquer modo, a válvula prèviamente atacada constitui o fator principal dado o grande número de casos em que o fato se verificou. Em primeiro lugar, figuram as lesões deixadas pelo reumatismo, conforme já vimos. Há mesmo autores que pensam tratar-se de uma só doença. De um modo geral, a endocardite ocorre com mais freqüência nos doentes de insuficiência aórtica isolada ou em combinação com alterações valvulares. Menos nos que acusam lesões mitrais e menos ainda nos que revelam forte sôpro sistolico mitral. A forma subaguda ocorre raramente nos doentes com sopros cardíacos e nos hipertensos como nos que têm perturbações do tônus e nos que tiveram fibrilação auricular. Nas doenças congênitas tem sido mais assinalada nas válvulas aórticas a presença de *ductus arteriosus*. Em suma, são mais sujeitos os indivíduos portadores de alterações valvulares reumáticas, de doença cardíaca congênita, que se encontram em bom estado de saúde e com o ritmo cardíaco normal. A forma subaguda é pouco observada em indivíduos portadores de hipertensão ou, mesmo, sem alterações cardíacas, assim como nos casos de fibrilação auricular.

Para Keefer, Grant, Wood e Jones os trombos com predominância de plaquetas servem de ponto de partida. Desempenham o mesmo papel da lesão preexistente. Êsses trombos podem ocorrer em válvulas atacadas ou nao e nós ficamos sem poder explicar tal fato, assim como o seu aparecimento nas lesões cardíacas congênitas. Na maioria dos casos de autópsia não se ob-

servaram lesões trombóticas, assim como a endocardite trombótica terminal é comum em outras manifestações, as mais variadas. Quando se observam trombos nas margens da válvula é mais fácil, segundo Held e Lieberson, interpretá-los como processo evolutivo do que como causa preexistente. Para os mesmos autores as alterações patológicas e decurso clínico devem ser atribuídos à reatividade local e geral e a imunidade do sistema retículo-endotelial e do endotélio das válvulas e do coração em particular são responsáveis pela evolução lenta da doença. Não havendo complicações (trombos etc.) só se processa a morte depois que o sistema retículo-endotelial se exaure. Esta a razão principal por que a evolução é prolongada, terminando quase sempre pela morte. A natureza endotelial da doença fala em favor dessa interpretação, sendo o sistema retículo-endotelial de tal modo invadido que já se lhe tem dado o nome de endoteliose infecciosa.

Aplicáveis aos fatos referidos, Sigmund descrevera três tipos de reação por parte do organismo: 1) ausência de reatividade; 2) reatividade normal; 3) hiper-reatividade. A endocardite lenta entraria no último tipo. Em vista da grande resistência local, há depósito de fibrina e plaquetas como acontece em outros ferimentos. Êste depósito facilitará a proliferação de germes. Kaefer atribui ao trombo de fibrina e plaquetas o caráter primário ao passo que Held e Lieberson acham que o mesmo é causado pela ação das bactérias sôbre os capilares e é dêstes que saem as plaquetas e fibrina. Pelas experiências de Mills, Necheles e Chu, têm importância os exercícios e a fadiga de que resulta o acúmulo de plaquetas no endocárdio, o que verificaram êsses autores, experimentalmente. Os aglomerados serão, nesses casos, primitivos e podem favorecer a posterior proliferação bacteriana. Chegamos ao ponto de analisar como se infeta a válvula. Será pelos capilares da mesma, formando-se no seu interior os êmbolos bacterianos, ou os germes atacarão pela superfície? Há autores que são partidários da primeira hipótese mas nós sabemos que os vasos das válvulas não se observam em todos os indivíduos e nestes casos verifica-e, ainda, que a infecção bacteriana é superficial, na periferia dos trombos. O mesmo se observou em lesões recentes. Nestas os germes parecem invadir a válvula pela superfície.

Já se observou que o estreptococo cresce bem na fibrina, *in-vitro* (Friedmann, Katz, Howell, Lindner, Mendlowitz). Leary e outros autores verificaram que nas vegetações novas há um leito de células em proliferação, logo cobertas de fibrina servindo de focos para bactérias.

Seja como fôr, a bacteriemia permanente ou passageira é imprescindível para que haja o ataque ao endocárdio.

Outro ponto da questão que assumiu maior importância é o que se refere ao estado de imunidade em que se encontra o organismo. Em conseqüência do mesmo, os germes não suportam a ação dos anticorpos e localizam-se em pequenos pontos do endocárdio ou outros, em nichos onde se abrigam depois de provocar a reação caracterizada pelo coágulo de fibrina e plaquetas, reproduzem-se com facilidade maior e ocasionam, dessa maneira, quase sempre, a forma lenta da endocardite.

No que se refere ao isolamento da bactéria responsável, vimos, pelo exposto, que nem sempre se tem conseguido êsse desiderato, mesmo dos casos clínicos típicos de endocardite malígna. São múltiplas as condições que podem influir sôbre essa aparente anomalia. Em primeiro lugar, têm-se observado anticorpos circulantes que, nesses casos, tornarão impossível a permanência das bactérias vivas em sua presença e facilitam, portanto, a localização das mesmas no endocárdio ou em outros pontos. O próprio poder bactericida natural do sangue tem sido invocado para explicar essa observação corrente.

Esta questão tem muita importância e, para certos autores, como Jaubert e Marchal, o diagnóstico de endocardite só pode ser feito quando a hemocultura é positiva. A maioria, no entanto, não vai a êsse exagêro, firmando-se também nos caracteres clínicos e anatômicos. O fato é que, com ou sem razão aparente, as hemoculturas são negativas em percentagens variáveis conforme os autores e, muitas vêzes, assim se mostram nos mesmos casos, em exames repetidos. Sob êsse ponto de vista é muito ilustrativa a nossa observação número 10 cujas cinco hemoculturas praticadas em épocas e condições diferentes foram sempre negativas e o exame necroscópico revelou lesões características de endocardite, assim como fôra típica a evolução clínica. Das lesões valvulares, em cultura pura, isolamos o germe responsável que proliferou bem no mesmo meio que servira para a hemocultura. O que mais singularizou esta nossa observação foi que o sôro do doente, colhido em vida, não exerceu ação impediente sôbre a proliferação do germe que isolamos naquele meio.

Para Keefer, as hemoculturas são negativas em 20 a 25% dos casos e esta bacteriemia negativa constitui um dos pontos que dificultam o diagnóstico ao lado dos casos de doença ativa sem sinais valvulares ou, ainda, quando êstes casos coincidem com aquêles.

Clinicamente não se observa diferença entre os casos com ou sem bacteriemia. Para estes é mais comum a acentuação da insuficiência suprarenal. Como já dissemos a percentagem de hemoculturas positivas varia e essa variação, conforme os autores, deve-se às condições de trabalho diferentes em que os mesmos se colocam. Muitos dos casos negativos citados na literatura

correrão por conta de emprêgo de técnica inadequada e meios de cultura impróprios. Além disso, devemos ter em conta os casos em que os exames devem ser repetidos. Ottenberg aconselha culturas com sangue retirado de diversos vasos na mesma ocasião. A seu favor temos as observações de Zdansky que, em nove casos observou diferença evidente a favor da hemocultura com sangue arterial e sòmente em um a favor do sangue venoso o que, além do mais, assinala a origem cardíaca da infecção. De preferência o sangue deve ser colhido no acme térmico e quando, apesar disso, é negativo o resultado, repetir o exame também no declínio da temperatura. Semear de 10 a 20 cc de sangue por 200 cc do meio. A cultura, colocada na estufa a 37° C., deve ser observada por tempo mais prolongado do que o que se usa habitualmente, até um mês ou pouco mais, conforme as suspeitas. Além dos estreptococos de vitalidade diminuida há germes de proliferação lenta, como as brucelas.

Quando as hemoculturas, por punção venosa, são negativas, alguns autores aconselham as hemoculturas com sangue colhido por punção das gengivas. Estas são especialmente indicadas nas septicemias crônicas, de caráter mais benigno. Para certas autores a gengiva desempenha o papel de emunctório bacteriano. Jouve obteve, em dois casos de endocardite lenta, hemoculturas positivas de sangue gengival sendo, o germe isolado idêntico ao que se isolou do sangue da veia. Quando a hemocultura feita com sangue colhido da veia foi negativa, êsse autor não a obteve positiva com o sangue das gengivas, nos poucos casos que observou. Esta observação não deixa, a nosso ver, de tirar um certo valor da opinião dos que atribuem papel etiológico, nas endocardites, ao germe que se isola de focos dentários. Terão êles penetrado na corrente sanguínea depois de provocar a infecção focal ou estarão sendo eliminados?

Um ponto sôbre o qual os autores insistem é na repetição dos exames visando isolar o germe ou mesmo para verificação da persistência da bacteriemia ou septicemia. Para Marchal e Jaubert várias hemoculturas positivas indicam prognóstico muito mais grave.

Há autores, como Liegeois e Albot, que ligam importância ao grau de bacteriemia, indicada pelo número de bacterias por cc, em relação à gravidade da infecção. Outros, como Weiss e Ottenberg, não vêm relação alguma entre as duas ocorrências.

Estudo bacteriológico

Tomando por base os inúmeros trabalhos sôbre a bacteriologia das endocardites iniciamos as nossas pesquisas, nesse sentido, de acôrdo com o aparecimento dos casos nos Serviços Clínicos do Hospital São Francisco de Assis,

assim como no de necroscopias, cuja parte bacteriológica está a nosso cargo. Pelo que frisam os autores que trabalham no assunto e pela nossa experiência ficamos convencidos da grande importância do meio a empregar nas hemoculturas e das condições em que a mesma deve ser praticada.

Temos usado, para tal fim, com os melhores resultados, depois de numerosos ensaios, o meio de Huntoon. E' o mesmo colocado em balões, semeando-se 10 a 20 cm3 de sangue para 200 cm3 do meio.

Para o isolamento de material colhido do cadáver do sangue, lesões ou órgãos) usamos os meios sólidos de ágar-sangue, ágar-ascite e ágar simples.

Depois de feitas as semeaduras são os meios colocado na estufa a 37° e os exames feitos a partir de 24 horas. Os balões permanecem em observação até 2 mêses, conforme recomendação de muitos autores se bem que nunca tivéssemos observado hemocultura que não se manifestasse positiva no máximo quatro dias depois de retirado o sangue. As demais foram definitivamente negativas.

Preocupou-nos também, na execução do presente trabalho, verificar o valor dos exames *post-mortem,* principalmente depois da leitura da publicação de Epstein e Kugel, feita em 1929.

Dizem êsses autores que, praticando exames bacteriológicos em cadáveres, obtiveram 37 culturas positivas do músculo cardíaco em 42 casos e que em 43 exames de válvulas cardíacas sòmente quatro se mostraram estéreis. Em 66 culturas do sangue, uma espécie bacteriana sempre se isolou. O estreptococo foi isolado do sangue em 79%, do músculo cardíaco em 47% e de válvulas normais em 40%.

No serviço de autópsias em que trabalhamos tivemos ocasião de praticar exames bacteriológicos de material colhido do sangue do coração, das válvulas cardíacas, do músculo cardíaco e do baço em inúmeros casos. Era nosso intuito verificar a possibilidade dos achados de Epstein e Kugel. O exame do sangue do coração de 110 cadáveres revelou sempre o germe causador da doença, à exceção de raros casos de contaminação evidentemente cadavérica. O mesmo verificamos de material colhido nas válvulas em 40 casos. Nunca isolamos qualquer germe de válvulas normais.

Conforme se vê, bem diferentes foram os nossos resultados. Não pudemos explicar como conseguiram aquêles autores as observações que referem.

Conforme se verá pelas observações, nós isolamos, dos casos de endocardite aqui citados, quer pela hemocultura quer pela sementeira de material colhido do cadáver ou de ambos os modos, o *Diplococcus pneumoniae,* o *Strep-*

tococcus haemolyticus, o *Streptoccocus viridans*, o *Staphylococcus aureus*, o *Staphylococcus albus*, a *Escherichia coli*, a *Klebsiella pneumoniae* e a *Neisseria gonorrhoeae*.

Adotamos para o seu diagnóstico o seguinte critério, de acôrdo com publicações nossas anteriores :

Diplococcus pneumoniae : diplococos lanceolados, Gram positivos, encapsulados. Fermentam a inulina e são lisáveis na bile. Proliferação escassa ou nula nos meios usuais de cultura. No ágar-sangue ou ágar-ascite as colônias são discóides, pequenas, úmidas, lisas e transparentes, com centro levemente deprimido. Patogênico para o camondongo, que é o animal de escolha, e para outros animais de laboratório.

Streptococcus haemolyticus : cocos grupados em cadeias mais ou menos longas, estas principalmente nos meios líquidos. Ausência de cápsulas. Não fermentam a inulina. Fermentam a salicina. Proliferação escassa ou nula nos meios usuais de cultura. Na ágar-sangue ou ágar-ascite as colônias são discóides, pequenas, lisas, úmidas e transparentes. Em volta das mesmas nota-se halo claro resultante final da hemólise. Patogênico para animais de laboratório.

Streptococcus viridans : caracteres semelhantes aos do anterior com a diferença de dar, nos meios sólidos com sangue, halo esverdeado em tôrno da colônia ou ela própria esverdeada, em virtude da formação de metaemoglobina. Poder patogênico reduzido para animais de laboratório.

Staphylococcus aureus : cocos regulares, Gram positivos, aglomerados em forma de cacho de uvas. Proliferação abundante nos meios usuais de cultura, nos quais se observa, principalmente no ágar simples, a formação de pigmento amarelo dourado. Produz hemolisinas e é patogênico para animais de laboratório.

Staphylococcus albus : mesmos caractes do anterior a não ser o pigmento que, para êste, é branco.

Escherichia coli : Bastonetes Gram negativos, móveis, de 0,5 a 0,7 de micro por 1 a 2 micros. Não esporulados nem encapsulados. Fermentam a lactose. Reação do vermelho de metila positiva e de Voges-Proskauser negativa. Produzem indol e reduzem nitratos nos meios apropriados. As colônias na superfície do ágar são claras ou amareladas, tornando-se com o tempo mais escuras, úmidas, brilhantes, onduladas, com tendência a expandir-se. Não liquifaz a gelatina. Coagula o leite. Patogenicidade variável para animais de laboratório.

Klebsiella pneumoniae : bastonetes, imóveis, Gram negativos, de 0,6 a 1 micro por 2 a 3 micros. Não esporulado. Caráter importante : encapsulado. As colônias na superfície do ágar são úmidas, homogêneas, brilhantes, viscosas e com aspecto de pérola para algunmas amostras. Patogênica para animais de laboratório, principalmente para o camondongo.

Neisseria gonorrhoeae : diplococos Gram negativos, reniformes. Ausência de proliferação nos meios usuais de cultura. Nos meios albuminosos (ágar-sangue ou ágar-ascite) as colônias são pequenas, lisas, úmidas, transparentes. Fermentam a glicose. Distinguem-se do meningococo porque êste fermenta a maltose, além daquêle açúcar.

OBSERVAÇÕES

1 — Maria C.S., branca, brasileira, com 27 anos de idade, casada, doméstica. Internou-se na 13.ª enfermaria do Hospital São Francisco de Assis, Serviço do Dr. Sales Guerra, a 15 de julho de 1937. Apresentava febre oscilante entre 37,2° e 39,6° C, mais elevada à tarde. Apresentava também sinais de alterações pulmonares e pleurite. Faleceu a 21 de julho sendo autopsiada 5½ horas após a morte pelo Dr. Margarinos Tôrres. Foi-o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.516):

Endocardite ulcerosa mitral.

Insuficiência mitral.

Dilatação das cavidades do coração (Fig. 1).

Infartos cicatrizados múltiplos e infiltração difusa e em focos por grandes mononucleares (nódulos de Aschoff ?) no coração.

Broncopneumonia confluente de todos os lobos de ambos os pulmões.

Esplenite aguda.

Infartos múltiplos do baço.

Infarto do rim direito.

Adenomas múltiplos da supra-renal esquerda.

Congestão crônica passiva, degenerescência parenquimatosa e infiltração gordurosa do fígado.

Pleurite fibrosa crônica adesiva circunscrita bilateral.

Hidrotórax duplo.

Gastrite crônica.

Degenerescência policística do ovário.

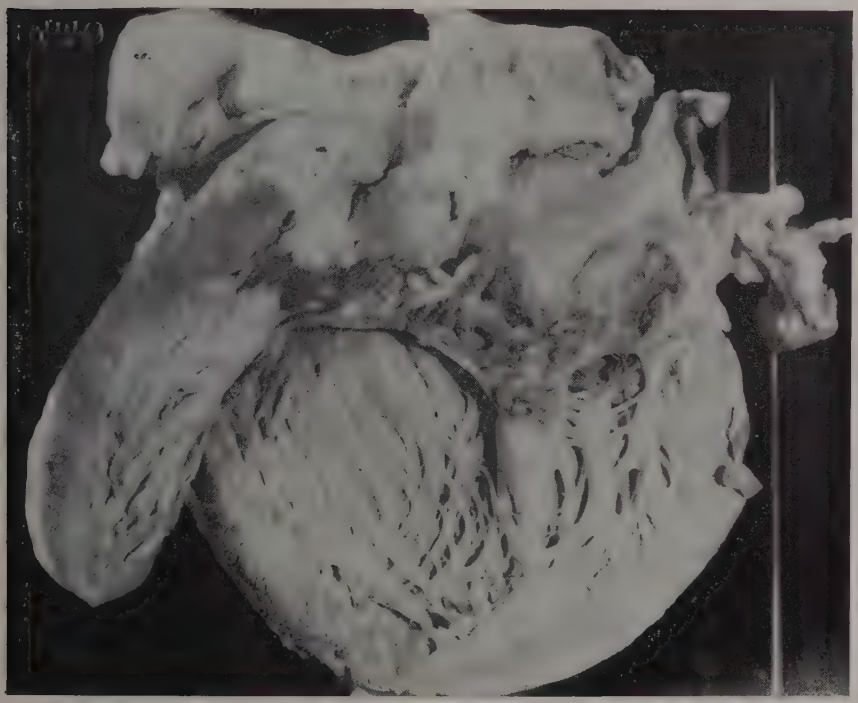


Fig. 1

Obs. 1 — M.C.S. — Endocardite ulcerosa mitral. Insuficiencia mitral. Dilatação das cavidades do coração.

Exames bacteriológicos : Do material colhido do sangue do coração não se isolou nenhum germe, assim como do material colhido do baço. Do material colhido das lesões do endocárdio isolou-se o *Diplococcus pneumoniae*. Ao microscópio presença de cocos principalmente diplococos Gram positivos, lanceolados. (Fig. 2).

2 — Tufi B., branco, brasileiro, com 25 anos de idade, solteiro, empregado no comércio. Internou-se na 15.ª enfermaria do Hospital São Francisco de Assis, Serviço do Dr. Thompson Mota, a 2 de agôsto de 1937. Pelos exames

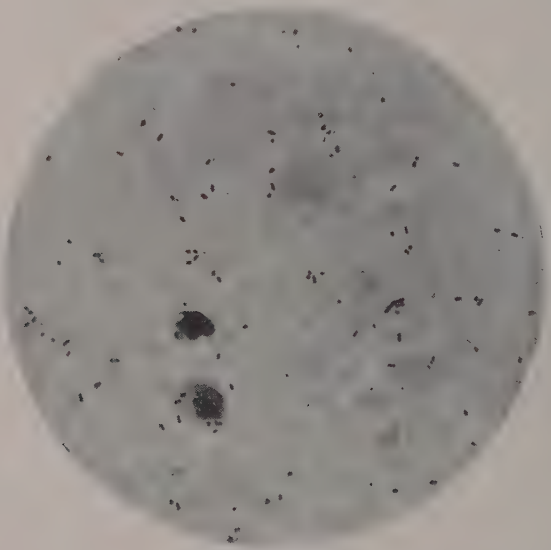


Fig. 2
Obs. 1 — M.C.S. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se os diplococos lanceolados, posteriormente identificados ao *Diplococcus pneumoniae*.

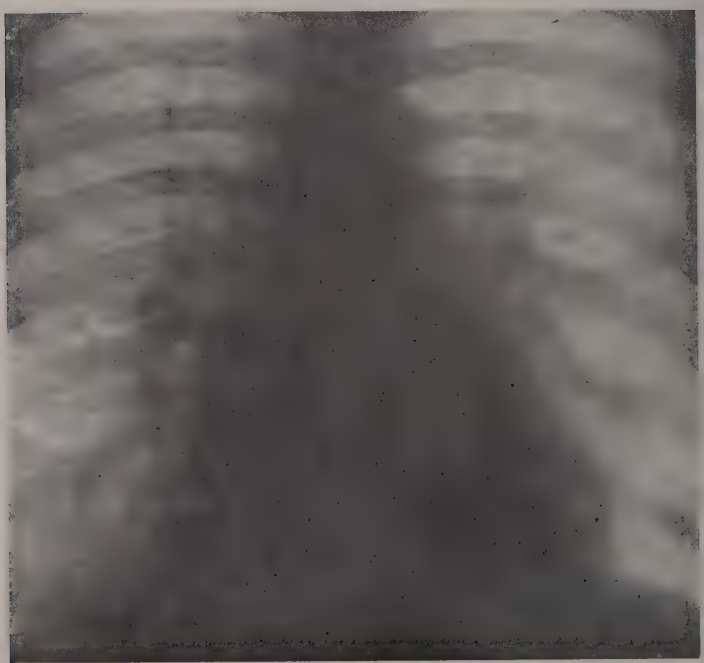


Fig. 3
Obs. 2 — T. B. — 1.ª radiografia tirada a 17/7/37. Dilatação do coração.

procedidos assim como pelos antecedentes foi feito o diagnóstico de septicemia crônica e andocardite lenta. Temperatura máxima 40°. As radiografias, do coração mostraram aumento progressivo dêsse órgão. (Figuras 3 e 4). Faleceu a 4 de agôsto sendo autopsiado 6 horas após a morte pelo Dr. Magalhães Tôrres. Foi o seguinte o

Fig. 4

Obs. 2 — T.B. — 2.ª radiografia tirada a 1/8/37. Dilatação do coração. Notar a diferença comparando-se com a 1.ª radiografia.

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.520) :

Endocardite ulcerósa mitral com extensão para o endocárdio da aurícula esquerda.

Insuficiência mitral.

Dilatação de tôdas as cavidades do coração.

Pericardite fibrinosa aguda e fibrosa crônica.

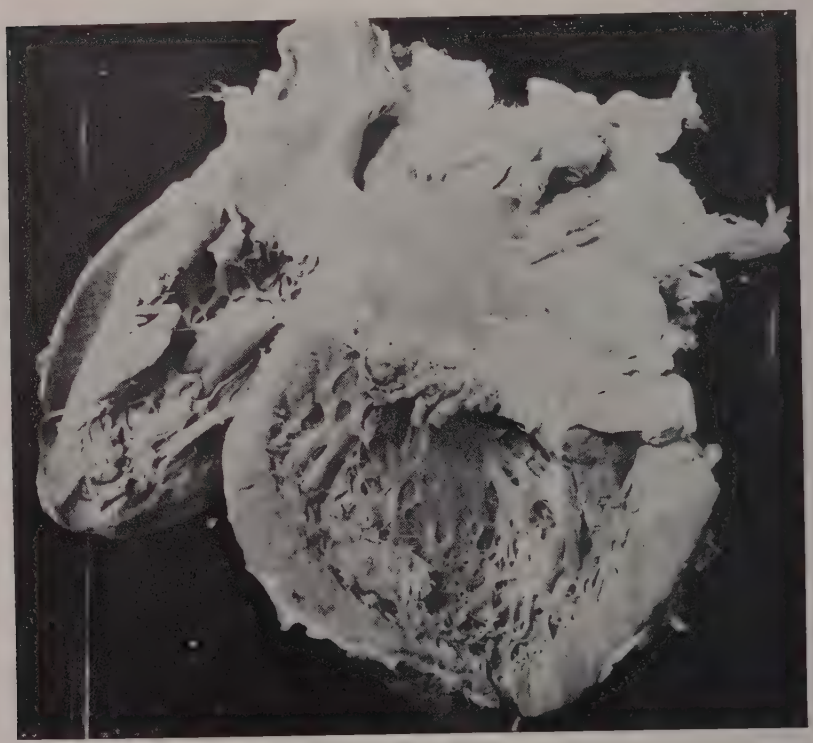


Fig. 5

Obs. 2 — T.B. — Endocardite ulcerosa mitral com extensão para o endocardio da aurícula esquerda. Dilatação de todas as cavidades do coração.

Congestão crônica passiva dos pulmões.

Hemorragias dos pulmões.

Pleurite fibrosa crônica adesiva extensa direita.

Hidrotórax duplo.

Hidroperitônio.

Infartos múltiplos do baço e do rim esquerdo.

Congestão crônica passiva do fígado.

Exames bacteriológicos : Do material colhido do sangue do ventrículo esquerdo isolou-se o *Streptococcus hemolyticus* e o *Staphylococcus aureus* e das lesões do endocárdio sòmente o *Streptococcus hemolytieus*. Ao exame microscópico presença de cocos em cadeias, Gram positivos (Fig. 6).

Fig. 6

Obs. 2 — T.B. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se estreptocócos em cadeias longas, posteriormente identificados ao *Streptococcus hemolyticus*.

3 — Antônio B.C., branco, brasileiro, com 29 anos de idade, casado, industrial. Internou-se na 15.ª enfermaria do Hospital São Francisco de Assis, Serviço do Dr. Thompson Mota, a 10 de agôsto de 1937. Apresentava febre irregular, em geral 37,5° C à tarde. Uma só vez atingiu a 38,6° C. Pelos antecedentes e exame clínico foi feito o diagnóstico de doença de Osler. Faleceu a 25 de agôsto sendo autopsiado 10 horas após a morte pelo Dr. Magarinos Tôrres. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.536):

Endocardite verrucosa e ulcerosa mitral e aórtica.
Dilatação e hipertrofia de tôdas as cavidades do coração.
Aterona da aorta.
Infartos múltiplos do baço e do rim direito.

Fig. 7
Obs. 3 — A.B.C. — Endocardite verrucosa e ulcerosa mitral e aortica. Dilatação e hipertrofia de tôdas as cavidades do coração.

Congestão crônica passiva, edema e atelectasia dos pulmões.
Hidropericárdio (1.060 cm3).
Hidrotórax duplo.
Hidroperitônio.
Edema das palpebras, pênis, escroto e membros inferiores.
Esplenite aguda.
Congestão crônica passiva do fígado.

Exames bateriológicos : Do material colhido do sangue do coração não se isolou nenhum germe. Mesmo resultado com o material colhido por punção do baço. Do material colhido do infarto do baço isolou-se o *Diplococcus pneumoniae*. O mesmo germe também se isolou das lesões do endocárdio. Em cultura pura nos dois casos. Ao exame microscópico dos esfregaços das lesões do endocárdio presença de cocos Gram positivos, dispostos irregularmente assim como morfològicamente atípicos. (Fig. 8). Nos esfregaços da polpa esplênica notamos a presença de diplococos Gram positivos lanceolados, caracteres morfológicos de pneumococo. (Fig. 9).

4 — Josué L. P., prêto, brasileiro, com 43 anos de idade, casado, operário. Internou-se na 1.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. Agenor Pôrto) a 14 de junho de 1937. Apresentava febre irregular seguida de longos períodos afebris. A temperatura nunca atingiu os 38° C. Reação de Wasserman positiva (++++). Insuficiência aórtica e pequenas alterações pulmonares. Faleceu a 17 de setembro de 1937, sendo autopsiado 7 horas e meia após a morte, pelo Dr. Coutinho da Silveira. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.551):

Endocardite verrucosa e ulcerativa mitral e aórtica.
Dilatação do coração.
Fibrose e hiperemia do miocárdio.
Arteriosclerose.
Aortite crônica.
Infartos do baço e do rim direito.
Edema e hiperemia passiva dos pulmões.
Hiperemia passiva do fígado e do baço.
Hidrotórax.
Hidroperitônio.
Perihepatite crônica.

Exames bacteriológicos : Não se isolou nenhum germe do material colhido do sangue do coração assim como do material colhido por punção do baço. Do que se colheu das lesões do endocárdio isolou-se o *Diplococcus*

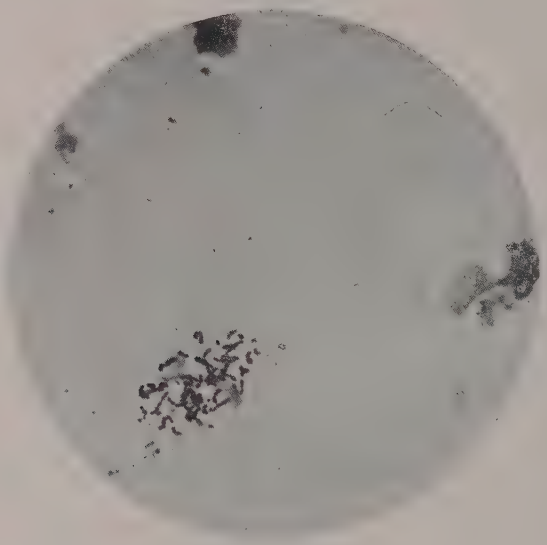


Fig. 8
Obs. 3 — A.B.C. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se cocos isolados ou diplococos, morfologicamente irregulares. Nas culturas do mesmo material verificou-se a presença exclusiva do pneumococo.

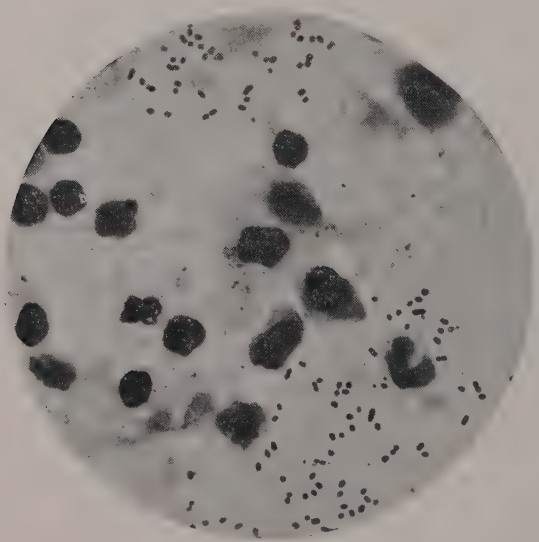


Fig. 9
Obs. 3 — A.B.C. — Esfregaço de polpa esplenica. Vêm-se os diplococos lanceolados, aspecto característico do pneumococo.

pneumoniae. O exame microscópico dos esfregaços acusou a presença de diplococos Gram positivos e cocos isolados. (Fig. 10).

5 — Maria J.C., parda, brasileira, com 53 anos de idade, doméstica. Internou-se na 11.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço

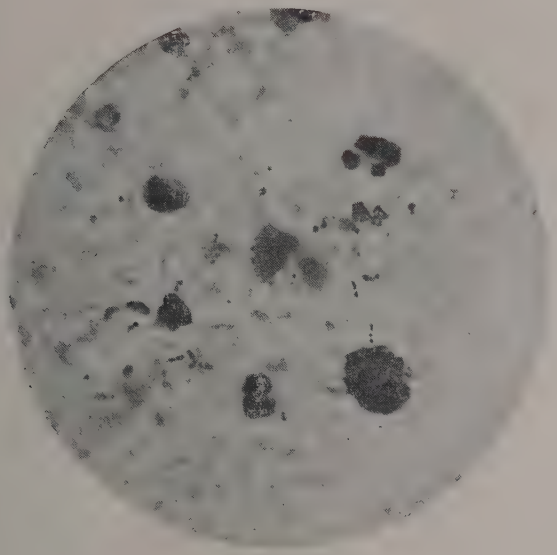


Fig. 10

Obs. 4 — J.L.P. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se diplococos lanceolados, alguns cercados de halo claro morfologia característica do pneumocôco.

do Prof. Leitão da Cunha) a 31 de dezembro de 1937. Teve o diagnóstico de endocardite mitral. Faleceu a 6 de janeiro de 1938, sendo autopsiada 4 horas e meia após a morte, pelo Dr. Magarinos Tôrres. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.588):

Endocardite verrucosa mitral.

Estenose e insuficiência mitral.

Hipertrofia e dilatação do ventrículo direito do coração. Atrofia parda. Hiperemia crônica passiva. Placa de endocardite.

Enfisema dos pulmões.

Pleurite fibrosa crônica, adesiva, extensa.

Infartos cicatrizados do baço.
Periesplenite e perihepatite crônica fibrosa.
Congestão crônica passiva do fígado.
Nefropatia crônica.
Aortite crônica (sífilis e arteriosclerose).

Exames bacteriológicos : Do material colhido do sangue do coração não se isolou nenhum germe. Do material colhido das lesões do endocárdio isolou-se o *Staphylococcus aureus* e alguns germes de contaminação cadavérica. Ao exame microscópico notamos a presença exclusiva de cocos aglomerados Gram positivos. (Fig. 11).

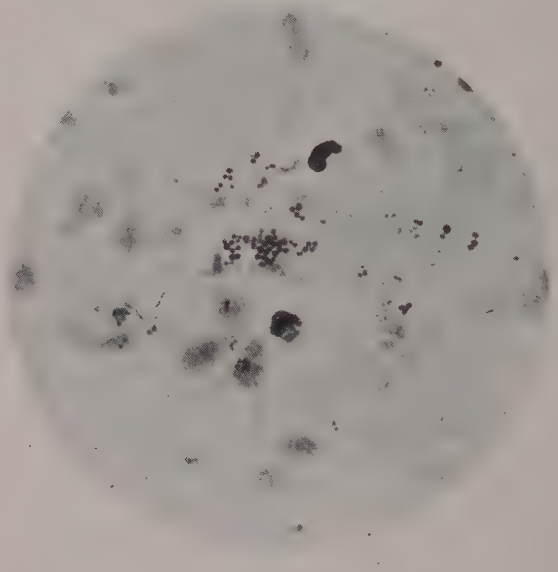


Fig. 11
Obs. 5 — M.J.C. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se cocos aglomerados, com a morfologia do estafilococo e posteriormente identificados a êsse germe.

6 — Antônio D. B., preto, brasileiro, com 36 anos de idade, casado, empregado no comércio. Internou-se na 1.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. Agenor Pôrto) a 4 de novembro de 1937. Procurou o Hospital por sentir muita canseira ao menor esfôrço, falta de ar, pernas inchadas e também notou que a parede do abdomen aumentava de volume. A doença começou há 8 meses. Além das doenças próprias da infância teve blenorragia.

O exame do aparelho cárdio-vascular revelou área cardíaca aumentada (figura 12); a ausculta revelou abafamento das bulhas cardíacas em todos os focos, taquicardia e sôpro sistólico. O exame dos pulmões revelou estertores subcrepitantes, roncos e sibilos em ambos os pulmões e crepitação na base direita.

Fig. 12

Obs. 5 — A.D.B. — Radiografia tirada quando esteve internado. Dilatação do coração.

Durante os dois mêses de tratamento apresentou surtos febris irregulares, tendo a temperatura máxima de 38,3° C.

Apresentava febre, geralmente à tarde, raramente além de 38° C. Sinais de alterações pulmonares. Exame de escarro negativo para *Mycobactrium tuberculosis*. Reação de Wassermann negativa (Fig. 12). Faleceu a 7 de janeiro de 1938, sendo autopsiado 8 horas e meia após a morte pelo Dr. A. Penna de Azevedo. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.591)

Endocardite parietal do ventrículo esquerdo.
Dilatação e hipertrofia do coração.
Tuberculose acinosa dos pulmões.
Tuberculose do miocárdio, fígado e rins.

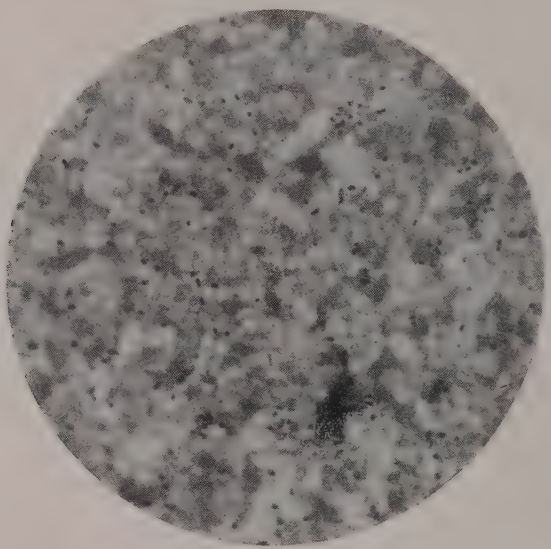


Fig. 13

Obs. 6 — A.D. B. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se diplococos lanceolados, semelhantes ao pneumococo e posteriormente identificados a êsse germe.

Linfandenite caseosa traqueobrônquica e do hilo dos pulmões.
Esplenite aguda.
Fibrose do miocárdio.
Peritonite tuberculosa.
Pleurite crônica fibrosa dupla.
Hiperemia do rim e do fígado.
Lipoma do rim direito.
Edema subcutâneo.

Exames bacteriológicos: Não se isolou nenhum germe do material colhido do sangue do coração e do que se obteve por punção do baço. Do material colhido das lesões do endocárdio isolou-se o *Diplococcus pneumoniae*. Ao exame microscópico notamos a presença de diplococos Gram positivos, lancelados. (Fig. 13).

7 — Alcides S. — prêto, brasileiro, com 17 anos de idade, solteiro, operário. Internou-se na 15.ª enfermaria do Hospital São Francisco de Assis, Serviço do Dr. Thompson Mota, a 30 de agôsto de 1937. Faleceu a 12 de janeiro de 1938 e foi autopsiado 18 horas e meia após a morte pelo Dr. Magarinos Torrês. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.601)

Endocardite verrucosa mitral.
Insuficiência e estenose mitral.
Dilatação e hipertrofia de ambos os ventrículos do coração.
Dilatação e hipertrofia da aurícula direita.
Ausência de nódulos de Aschoff nos tecidos da válvula e miocárdio.
Broncopneumonia hemorrágica dos lobos médio e inferior do pulmão direito.
Congestão crônica passiva dos pulmões, fígado e baço.
Pleurite fibrinosa aguda direita.
Nódulo no baço.
Adenoma e congestão crônica passiva das supra-renais.

Exames bacteriológicos: Do material colhido das lesões do endocárdio do baço e do sangue do coração isolou-se o *Diplococcus pneumoniae* ao lado de germes de contaminação, em pequena quantidade.

8 — Oscar S., pardo, brasileiro, com 29 anos de idade, operário. Internou-se na 2.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. Garfield de Almeida) a 13 de janeiro de 1938. Apresentava febre mais ou menos constante em tôrno dos 38° C., tendo atingido até 39,5° C. Teve infecção blenorrágica 3 mêses antes. Praticamos duas hemoculturas que foram positivas para a *Neisseria gonorrhoeae*. Faleceu a 14 de fevereiro de 1938, sendo autopsiado 1 hora e meia após a morte pelo Dr. A. Pena de Azevedo. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANATOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.629)

Endocardite aórtica úlcero-vegetante.
Hidrotórax duplo.
Infarto anêmico do rim esquerdo.

Fig. 14
Obs. 8 — O.S. — Endocardite aortica ulcerosa.

Edema a hiperemia passiva e enfisema dos pulmões.
Hiperemia passiva do fígado.
Esplenite aguda.
Escara do pé esquerdo.

Exames bacteriológicos : Do material colhido da lesão valvular aórtica isolou-se a *Neisseria gonorrhoeae* em cultura pura. Ao exame microscópico notamos a presença de diplococos reniformes, Gram negativos, intra e extracelulares com a morfologia típica do gonococo. (Fig. 15).

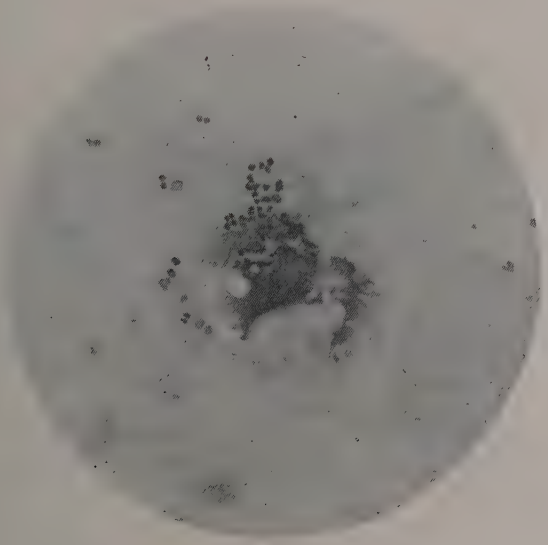


Fig. 15

Obs. 8 — O.S. — Esfregaço de material colhido das lesões aorticas, durante a autopsia. Vêm-se diplocócos intra e extracelulares, posteriormente identificados ao gonocóco.

9 — João R. M., prêto, brasileiro, com 34 anos de idade, operário, casado. Internou-se na 2.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. Garfield de Almeida), a 12 de julho de 1938. Faleceu a 20 do mesmo mês com o diagnóstico de pneumonia. A hemocultura praticada por nós, durante a doença, foi positiva para o *Diplococcus pneumoniae*. Foi autopsiado 19 horas após a morte pelo Dr. Magarinos Tôrres. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 3.790)

Pneumonia lobar de todos os lobos do pulmão direito, e lobo inferior do esquerdo. (hepatização cinzenta).

Pleurite fibrinosa aguda bilateral.

Endocardite ulcerosa aórtica.

Infiltração celular inflamatória no miocárdio, na vizinhança do anel aórtico.

Dilatação das cavidades direitas do coração

Esplenite aguda.

Ateroma da aorta.

Hiperemia e tumefação turva do rim

Pleurite fibrosa crônica extensa direita.

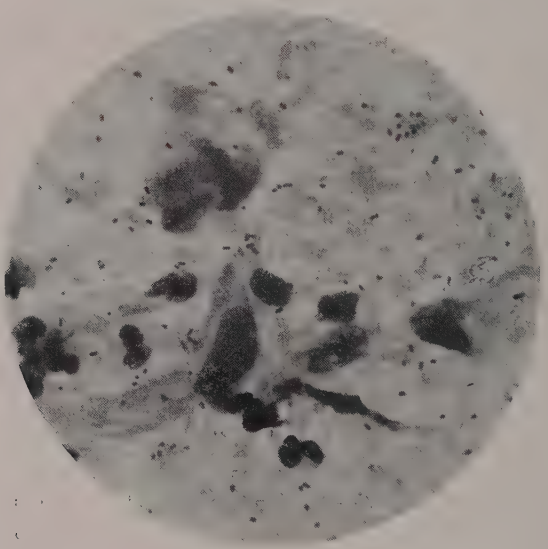


Fig. 16

Obs. 9 — J.R.M. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se diplococos lanceolados, alguns cercados de halo claro, morfologia característica do pneumococo e posteriormente identificados a êsse germe.

Espermatocistite crônica

Linfadenite catarral.

Fibrose do testículo.

Sub-icteràcia.

Exames bacteriológicos : Do material colhido das lesões do endocárdio isolamos em cultura pura o *Diplococcus pneumoniae*. Nos esfregaços notamos a presença de diplococos lanceolados, Gram positivos cercados de halo claro, morfologia típica do pneumococo. (Fig. 16).

10 — Maria J.R., branca, brasileira, em 32 anos de idade, solteira, doméstica. Internou-se na 12.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. Eurico Vilela) a 24 de fevereiro de 1939. Informou que a doença teve início 8 dias após um aborto processado 5 mêses antes de internar-se. Paciente pálida, abatida, com manchas hipercrômicas e petequias. Edema dos membros inferiores. O exame do coração revelou acentuação do tom da pulmonar com aumento de intensidade. Sôpro meso-sistólico audível em tôda a área cardíaca, mas de melhor audibilidade no foco pulmonar, pro-

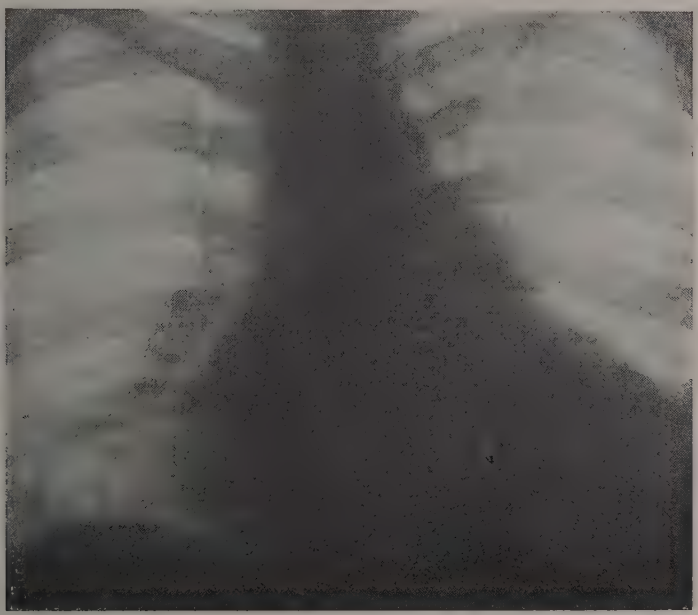


Fig. 17
Obs. 10 — M.J.R. — Radiografia obtida quando a doente esteve internada.

pagando-se para a clavícula esquerda. A radiografia revelou grande aumento da área cardíaca (Figura 17). Hepatomegalia e esplenomegalia. A temperatura oscilou entre 37,5 e 39° C. Fizemos 5 hemoculturas de 27 de fevereiro até 8 de abril. Tôdas negativas. O mesmo resultado se obteve com a hemocultura praticada após a prova da adrenalina tendo-se injetado 0,001 desta. A contagem dos glóbulos sanguíneos revelou: Hematias: 3.390.000 por mm3. leucocitos: 6.800. Neutrofilos (núcleo em bastão) 5%, neutrofilos (núcleo segmentado) 79%, cosinofilos 2%, linfocitos 11% e monocitos 3%. Taxa

de hemoglobina 55%. Reação de Wassermann negativa. A doente faleceu a 10 de abril de 1939 sendo autopsiada 16 horas e meia após a morte pela Dra. Rita Alves Cardoso. Foi o seguinte o diagnóstico anátomico com verificação microscópica (Protocolo 4.622). "Endarterite vegetante pulmonar. En-

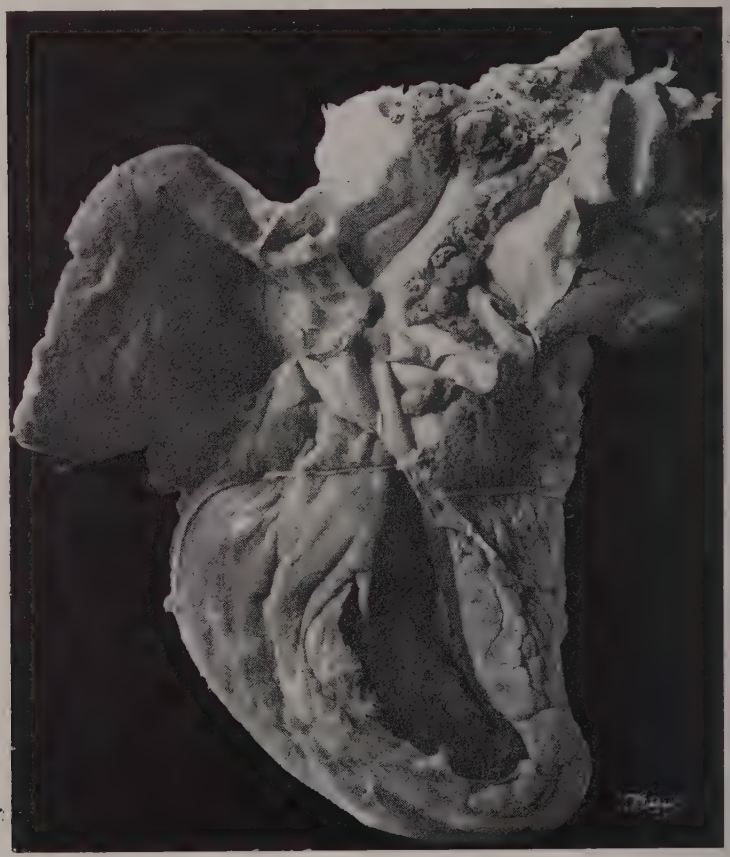


Fig. 18

Obs. 10 — M.J.R. — Endocardite vegetante pulmonar. Endocardite crônica da válvula pulmonar. Hipertrofia do ventrículo esquerdo.

docardite crônica da válvula pulmonar. Hipertrofia do ventrículo esquerdo (Fig. 18). Infartos sépticos múltiplos dos pulmões. Infartos cicatrizados dos rins. Glomérulos nefrite embólica e hemorragias nos espaços capilares dos glomérulos. Congestão crônica passiva e degeneração gordurosa do fígado. Congestão do baço e esplenite aguda (leve). Gastrite crônica e petequias

na mucosa do estômago. Edema e congestão da camada cortical das supra-renais. Edema dos membros inferiores".

Exames bacteriológicos: Isolamos das lesões do endocárdio o *Diplococcus pneumoniae* em cultura pura. Nos esfregaços de material colhido das lesões da válvula da pulmonar observamos diplococos, Gram positivos, lanceolados, em grande número. Em cortes da lesão valvular observamos, ao lado de diplococos Gram positivos, cocos isolados e aglomerados, assim como elementos morfològicamente pouco característicos, todos Gram positivos. (Figura 19).

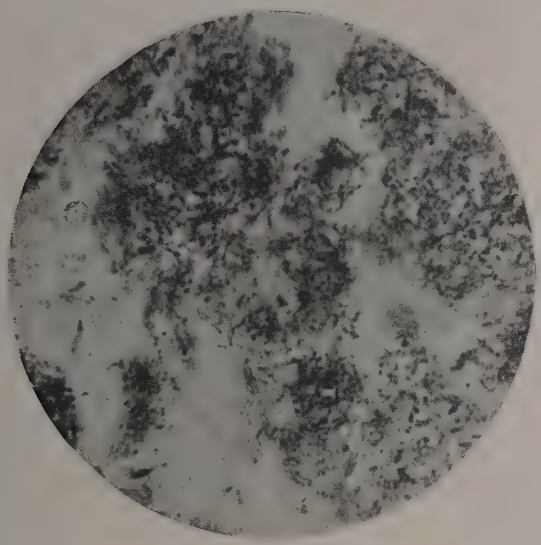


Fig. 19

Obs. 10 — M.J.R. — Córte da lesão valvular. Coloração pelo método de Gram. Vêm-se diplocócos ao lado de cocos isolados e aglomerados assim como elementos morfologicamente pouco característicos. Nas culturas feitas com material identico proliferou exclusivamente o pneumocóco.

11 — Maria T. M., branca, brasileira, com 18 anos de idade, doméstica. Internou-se na 13.ª Enfermaria do Hopistal São Francisco de Assis (Serviço do Dr. Sales Guerra) a 15 de maio de 1939. A doença, segundo informações da paciente datava de 2 mêses. Passado reumático. Durante o tempo em que esteve internada a temperatura oscilou entre 37,1 e 39,5° C. elevando-se à tarde. Pulso em tôrno de 100 nos primeiros dias de internada e 120 e 140 nos

últimos. A hemocultura feita a 23 de maio foi positiva para o *Strepctococcus viridans*. Apresentava no momento em que colheu o sangue palidez, dispnéia, ruído de galope, temperatura 37,1° C., pulso 116. A radiografia revelou grande aumento da área cardíaca com acentuação do arco pulmonar. Após trans-

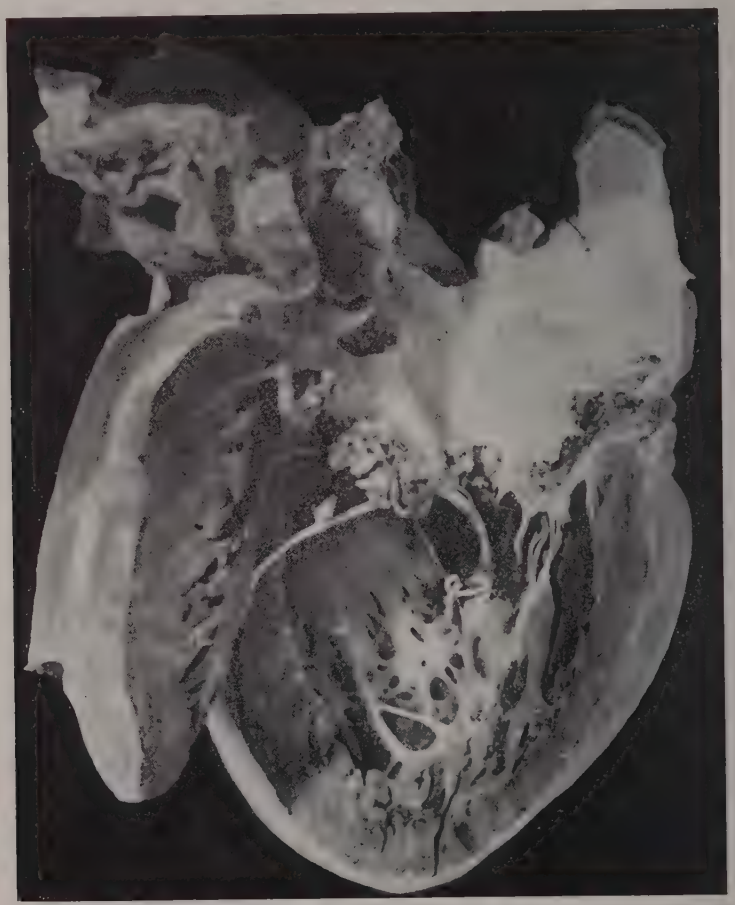


Fig. 20
Obs. 11 — M.T.M. — Trombo-endocardite aortica e mitral.

fusão de sangue (80 cc) melhorou ligeiramente. Como tratamento usou-se o "Krinotan" (p-amino-benzeno-sulfamida). A doente tomou 2 comprimidos de 0,35 grs. de 6 em 6 horas. Faleceu a 30 de maio do mesmo ano sendo autopsiada 11 horas após a morte pelo Dr. Magarinos Tôrres. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.671)

Trombo-endocardite ulcerosa aórtica e mitral. (Fig. 20).
Infarcto anêmico do baço.
Infarcto cicatrizado do rim direito.
Edema e congestão dos pulmões.
Congestão crônica passiva do fígado e do baço.
Hidrotórax duplo.
Hidropericárdio.

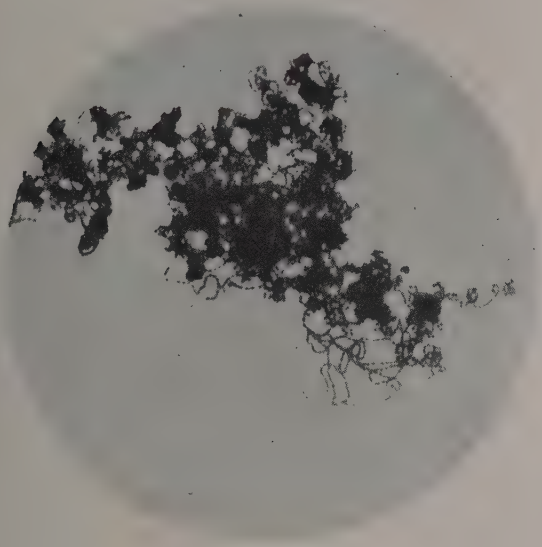


Fig. 21

Obs. 11 — M.T.M. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm estreptocócos em cadeias longas, posteriormente identificados ao *Streptococcus viridans*.

Dilatação e hipertrofia do ventrículo esquerdo do coração.
Dilatação das cavidades direitas do coração.
Nefrite embólica em focos, não purulenta.

Exames bacteriológicos : Das lesões do endocárdio isolamos em cultura pura o *Streptococcus viridans*. Ao exame microscópico dos esfregaços notamos a presença de cocos grupados em cadeias bastante longas, Gram positivos. (Fig. 21).

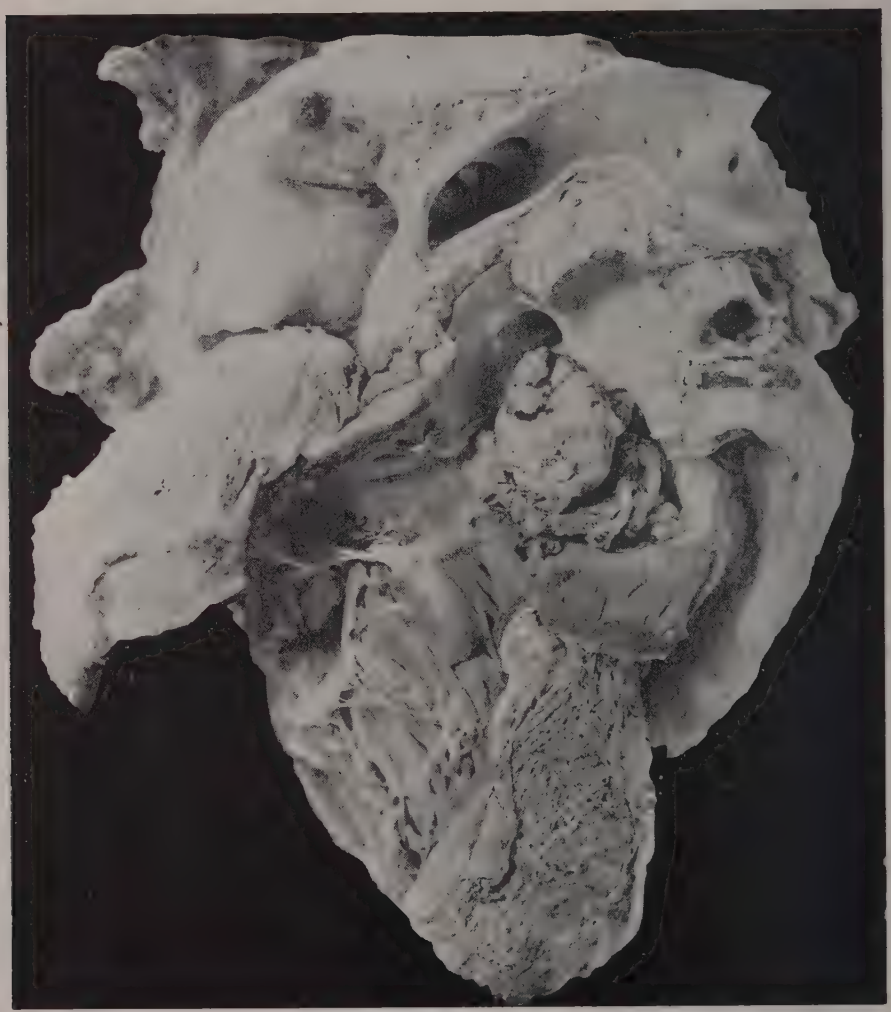


Fig. 22

Obs. 12 — A.S. — Endocardite ulcerativa e trombose da válvula pulmonar. Aneurisma da pulmonar. Rutura do aneurisma da pulmonar. Dilatação das cavidades do coração. Pericardite aguda fibrinosa.

12 — Amália S., parda, brasileira, com 28 anos de idade, doméstica. Internou-se na 19.ª Enfermaria do Hospital S. Francisco de Assis (Serviço do Prof. J. Moreira da Fonseca) a 12 de agôsto de 1939. Referiu um abôrto ocorrido 2 mêses antes. Temperatura entre 37 e 40,5° C. Pulso entre 100 e 140. Notaram-se nos pulmões estertores difusos que não justificaram o diag-

nóstico de pneumonia. Tosse. Escarro hemoptóico. A hemocultura feita a 14 de agôsto foi positiva para o *Diplococcus pneumoniae,* resultado obtido a 16. Nesse mesmo dia a doente faleceu sendo autopsiada 8 horas após a morte pelo Dr. Coutinho da Silveira. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.755)

Endocardite ulcerativa pulmonar com perfuração das lacínias. (Fig. 22).
Hematopericárdio.
Pericardite aguda fibrinosa.
Abcessos do pulmão.
Bronquite muco-purulenta.

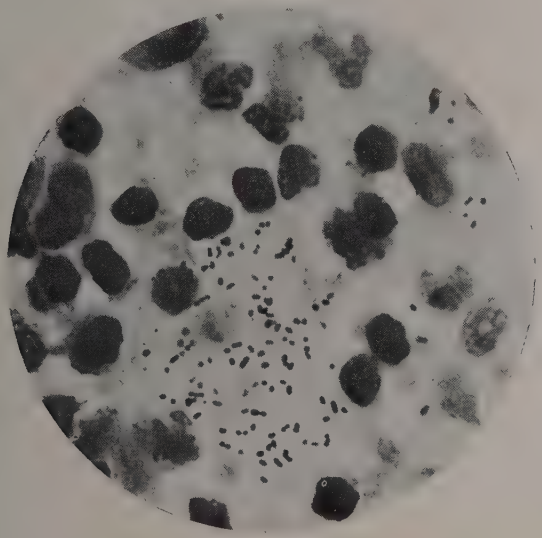


Fig. 23
Obs. 12 — A.S. — Esfregaço de material colhido do baço. Vem-se diplococos lanceolados, cercados de halo claro, morfologia típica do pneumocóco.

Broncopneumonia crônica interticial.
Edema e hiperemia passiva enfisema atelectasia e hemorragias do pulmão.
Glomerolo-nefrite.
Dilatação das cavidades cardíacas.
Esplenite aguda.
Hiperemia passiva do fígado.
Cisto do pulmão.
Corpos amarelos fibrosados do ovário.

Exames bacteriológicos: Isolamos o *Diplococcus pneumoniae* em cultura pura da lesão do endocárdio, dos pulmões e do baço. O exame bacterioscópico de material colhido das lesões valvulares e do baço revelou a presença de diplococos Gram positivos, lanceolados, cercados de halo claro, pneumococo; (Fig. 23).

Fig. 24
Obs. 13 — J.R. — Endocardite ulcerativa fifrinosa. Endocardite ulcerativa da mitral.

13 — Julieta Ribeiro, parda, brasileira, com 32 anos de idade, doméstica. méstica. Internou-se na 19.ª Enfermaria do Hospital S. Francisco de Assis (Serviço do Dr. A. Aguinaga) a 17 de outubro de 1939. Pulso 190. temperatura 42,5° C. Infecção após abôrto. Faleceu a 18 sendo autopsiada 24 horas após a morte pelo Dr. Pena de Azevedo. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.787)

Endocardite ulcerativa mitral. (Fig. 24).
Endometrite fibrinosa.
Colpite ulcerativa.
Esplenite aguda.

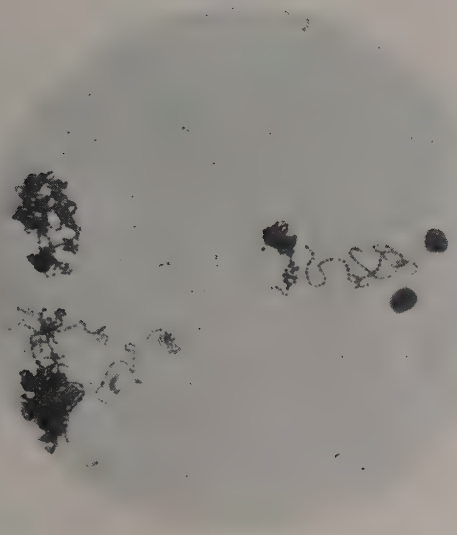


Fig. 25

Obs. 13 — J.R. — Esfregaço de material colhido das lesões do endocardio. Vêm-se cocos em longas cadeias, posteriormente identificados ao *Streptococcus hemolyticus*.

Peritonite circunscrita.
Infartos do braço e dos rins.
Glomerulonefrite.
Hiperemia passiva e edema dos pulmões.
Hiperemia passiva do fígado.
Atelectasia do lobo inferior do pulmão esquerdo.
Hidronefrose direita.

Exames bacteriológicos : De material colhido das lesões do endocárdio isolamos *Streptococcus hemolyticus, Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli.* O exame microscópico de esfregaços do mesmo material revelou exclusivamente a presença de cocos Gram positivos em cadeias. Nas culturas as colônias de *Staph. aureus* e *E. coli* foram raras e abundantes as do *Strep. hemolyticus.* (Fif. 25).

14 — João E. S. pardo, brasileiro, com 44 anos de idade, solteiro, operário. Internou-se na 4.ª Enfermaria do Hospital S. Francisco de Assis (Serviço do Dr. Jorge de Gouveia. Queixava-se o doente de dores na região renal e dificuldade de urinar. O exame revelou estreitamento uretral e órgão genitais internos muito edemaciados. O exame do coração revelou duplo sôpro audível na zona de batimento da ponta do coração com propagação para a axila, assim como duplo sôpro no foco aórtico.

O doente referiu ter tido as doenças próprias da infância e, posteriormente, blenorragia por duas vêzes e cancros venéreos. Refere também ter tido reumatismo cinco anos antes da moléstia atual, localizando-se as perturbações com predominância nas articulações coxo-femurais. Nessa ocasião ficou "entrevado" durante 3 mêses. Reação de Wassermann positiva (4 cruzes).

O doente esteve internado durante 11 mêses em conseqüência das suas perturbações no aparelho urinário, vindo a falecer a 23 de outubro de 1939. Durante o período de internamento teve alguns surtos de febre mas a temperatura, de regra, permaneceu em tôrno dos 37° C.

A autopsia foi praticada 9 horas e meia após a morte pelo Dr. A. Pena de Azevedo. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.789)

Endocardite vegetante aórtica e mitral. (Fig. 26).
Esplenite aguda.
Infartos do baço e dos rins. (Fif. 27).
Hipertrofia do coração.
Edema e hiperemia passiva dos pulmões.
Cistite fibrinosa.
Aortite sifilítica.
Hiperemia do fígado e dos rins.

Exames bacteriológicos : Isolamos de material colhido nas lesões do endocardio o *Streptococcus viridans* e o *Streptococcus aureus.* O exame dos esfregaços do mesmo material revelou a presença de cocos Gram positivos grupados em cadeias e em aglomerados. (Fig. 28).

15 — Carmelita F. S., branca, brasileira, com 28 anos de idade, doméstica. Internou-se na 12.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. Eurico Vilela). A doente faleceu a 12 de dezembro de 1939 sendo autopsiada no dia seguinte, 9 horas e 45 minutos após a morte, pelo Dr. Coutinho da Silveira. Foi o seguinte o

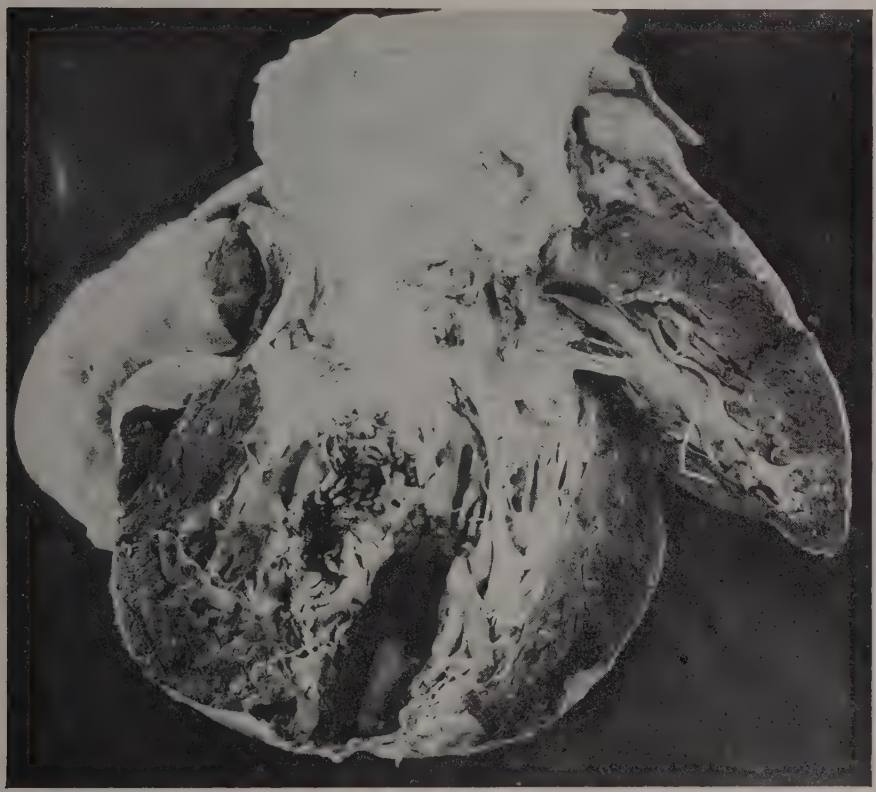


Fig. 26
Obs. 14 — J.E.S. — Endocardite vegetantes aortica e mitral. Hipertrofia do coração.

DIAGNÓSTICO ANATOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.783)

Endocardite crônica parietal do ventrículo esquerdo.
Trombose do ventrículo esquerdo.
Dilatação das cavidades cardíacas. (Fig. 29).

Esplenite aguda.
Edema e hiperemia passiva e hemorragias do pulmão.
Glomerulo-nefrite crônica.
Hiperemia passiva do fígado.
Hidrotôrax-duplo.
Hidropericárdio.
Encéfalo-malácia.

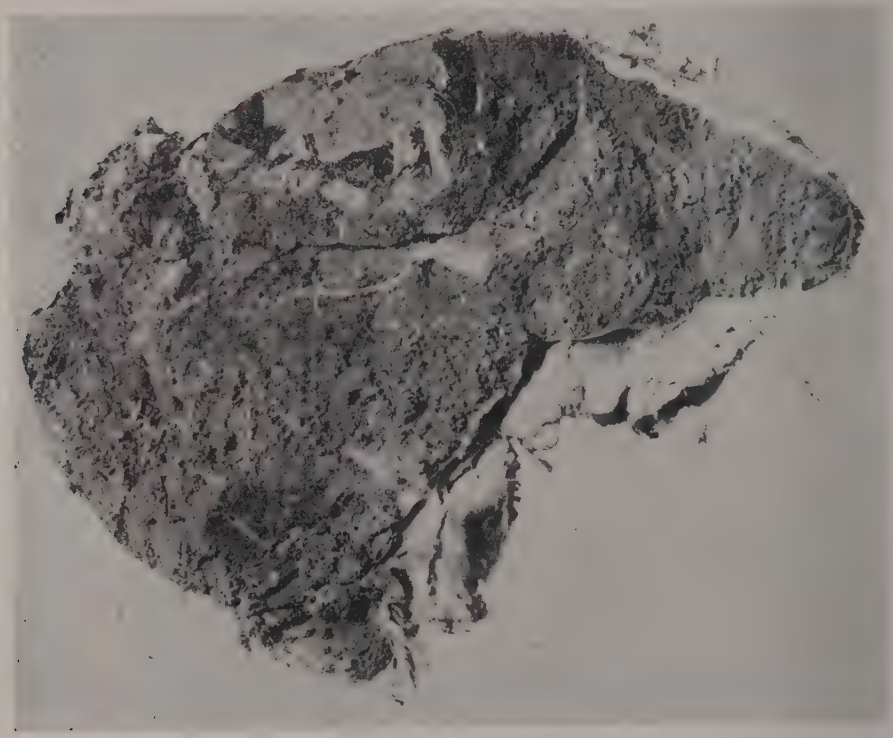


Fig. 27
Obs. 14 — J.E.S. — Infartos cicatrizados do baço.

Exames bacteriológicos: No esfregaço de material colhido das lesões do endocárdio observamos cocos Gram positivos aos pares e em pequenas cadeias e bacilos Gram negativos (Fig. 30). Os exames subseqüentes revelaram tratar-se do *Diplococcus pneumoniae* e da *Escherichia coli*.

16 — Eleonora D., branca, brasileira, com 40 anos de idade, doméstica. Internou-se na 12.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. Eurico Vilela). Faleceu a 17 de janeiro de 1940 sendo autopsiada 6 horas após a morte pelo Dr. Magarinos Tôrres. Foi o seguinte o

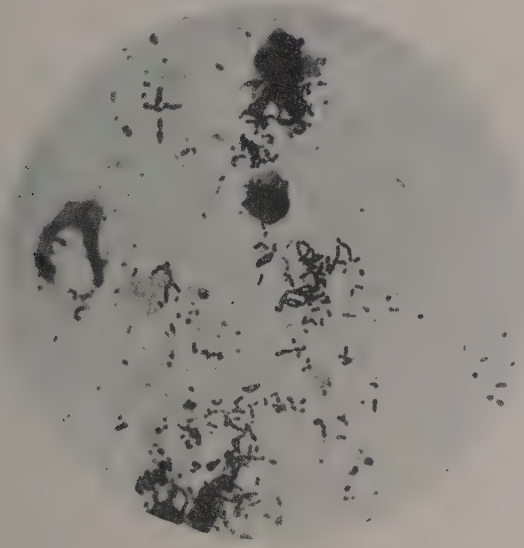


Fig. 28

Obs. 14 — J.E.S. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se elementos cocoides aglomerados semelhantes aos estafilocos e outros dois a dois ou em curtas cadeias. Nos meios de cultura houve proliferação de estafilococos e estreptococos.

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.831)

Endocardite verrucosa mitral e aórtica.
Estenose mitral.
Miocardite crônica fibrosa (Fig. 31).
Infarto hemorrágico do lobo inferior do pulmão direito.
Pleurite fibrinosa aguda direita.
Edema e congestão dos pulmões.
Hidrotoráx direito.
Hidroperitóneo.

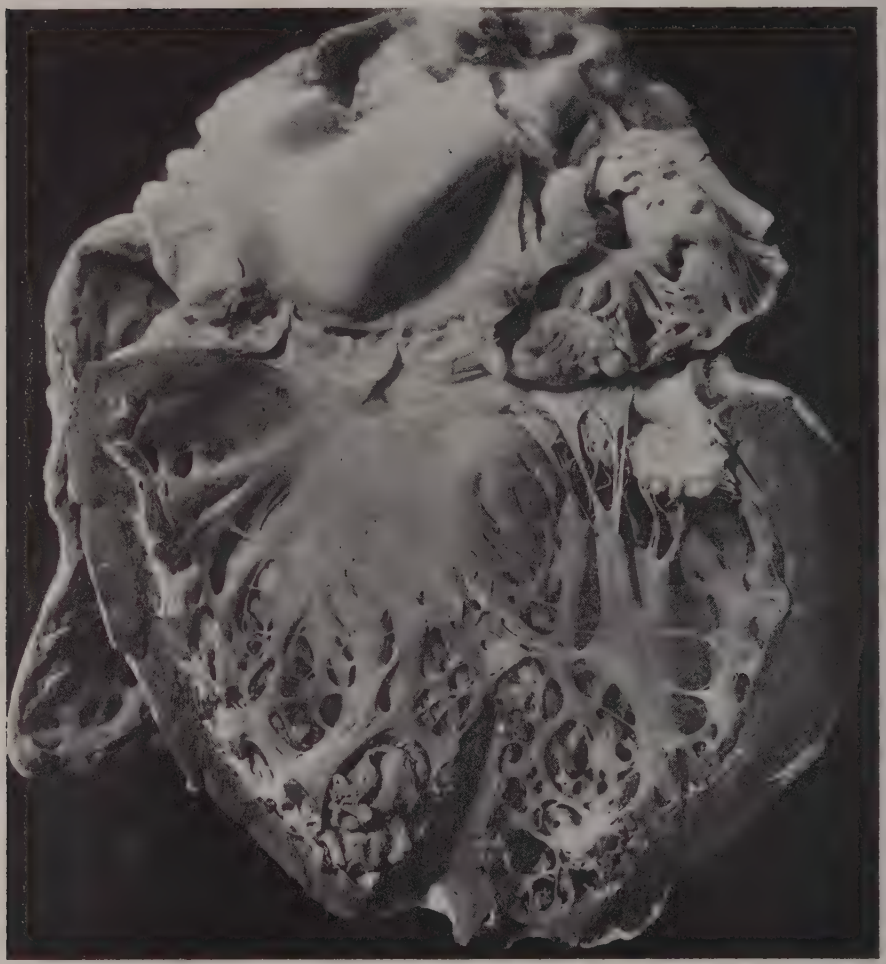


Fig. 29
Obs. 15 — C.F.S — Trombose do ventrículo esquerdo (ponta). Endocardite crônica parietal. Dilatação das cavidades do coração.

Congestão crônica passiva e infartos cicatrizados do rim.

Glomerulo-nefrite aguda.

Congestão crônica passiva, infiltração gordurosa e necrose centro-lobular do fígado.

Congestão crônica passiva e hialinose das artérias peniciladas e tecido reticulado dos corpúsculos de Malpighi, no baço.

Hiperemia e redução do conteúdo lipóide nas células da camada cortical da supra-renal.

Exames bacteriológicos : No esfregaço de material colhido das lesões valvulares observamos cocos Gram positivos em aglomerados, raros Gram negativos e bastonetes Gram negativos (Fig. 32). Nas culturas proliferaram germes com os caracteres do *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli.*

17 — Sebastião J. A., branco, brasileiro, com 27 anos de idade, solteiro, operário. Internou-se na 15.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Dr. Thompson Mota) a 29 de novembro de 1939. Apresentava

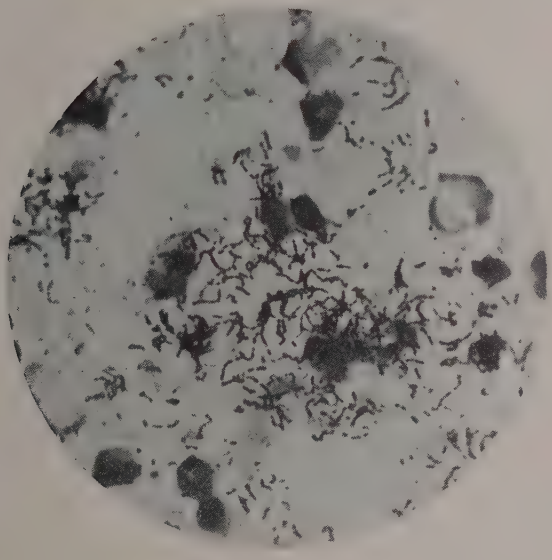


Fig. 30

Obs. 15 — C.F.S. — Esfregaço de material colhido das lesões do endocardio. Vêm-se alguns bastonetes curtos ao lado de diplococos, cocos esparsos ou grupados em curtas cadeias. Nos meios de cultura houve proliferação de pneumococos e colibacilos.

febre irregular entre 37 e 38° C. Esteve em tratamento até a data do falecimento a 6 de abril de 1940. A hemocultura praticada por nós a 21 de fevereiro de 1940 foi positiva para o *Streptococcus viridans.*

A autopsia foi feita 9 horas após a morte pelo Dr. A. Pena de Azevedo. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.884)

Endocardite ulcerosa mitral.
Endocardite crônica fibrosa aórtica. (Fig. 33).
Hipertrofia do ventrículo esquerdo.
Infartos do baço e dos rins.

Fig. 31
Obs. 16 — E.D. — Endocardite verrucosa da mitral e aortica. Estenose da mitral.

Hiperemia passiva do fígado.
Glomérulo-nefrite crônica.
Broncopneunomia.
Aneurisma da artéria femural esquerda.
Edema e hiperemia passiva dos pulmões.

Exames bacteriológicos : Do material colhido do sangue do coração e das lesões do endocárdio isolamos em cultura pura o *Streptococcus viridans*. O exame do material colhido do endocárdio revelou a presença de cocos Gram positivos grupados em cadeias geralmente longas. (Fig. 34).

18 — Izaltina M. B., branca, brasileira, com 29 anos de idade, casada, doméstica. Internou-se 18.ª Enfermaria do Hospital São Francisco de Assis (Serviço do Prof. J. Moreira da Fonseca). Disse que a doença começou em

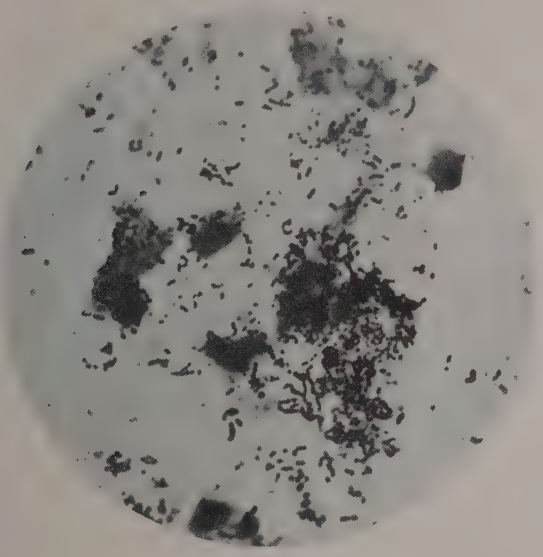


Fig. 32

Obs. 16 — E.D. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se cocos esparsos ou em aglomerados ao lado de bastonetes curtos. Nos meios de cultura houve proliferação de estafilocócos e colibacilo.

março do mesmo ano, por calefrio repentino e febre. Desde então tem esta continuado com pequenas intermitências. O exame do coração e vasos revelou pulso pequeno e mole com 120 batimentos por minuto. Bulhas abafadas. Sôpro sistólico na ponta, com ligeira propagação para a axila. Leve reforço do 2.º tom pulmonar. Arritmia provocada pelo aparecimento de extrasistoles. O exame ginecológico nada acusou de extraordinário. A 22 de junho praticamos hemocultura que foi positiva para o gonococo. 45 dias depois de internada manifestou-se artrite coxo-femural e 2 dias após mesmo

processo na articulação do joelho esquerdo. Outras articulações foram mais ou menos atacadas inclusive a têmporo-mandibular esquerda. O resultado do exame de sangue praticado a 13-6-40 foi o seguinte: hemoglobina 55%, hematias 2.700.000 por mm3., leucocitos 11.200 por mm3., neutrofilos (núcleo em bastão) 8%, (n. segmentado) 88%, eosinofilos 1%, linfocitos 6%, monocitos 5%. Ausência de hematozoários.

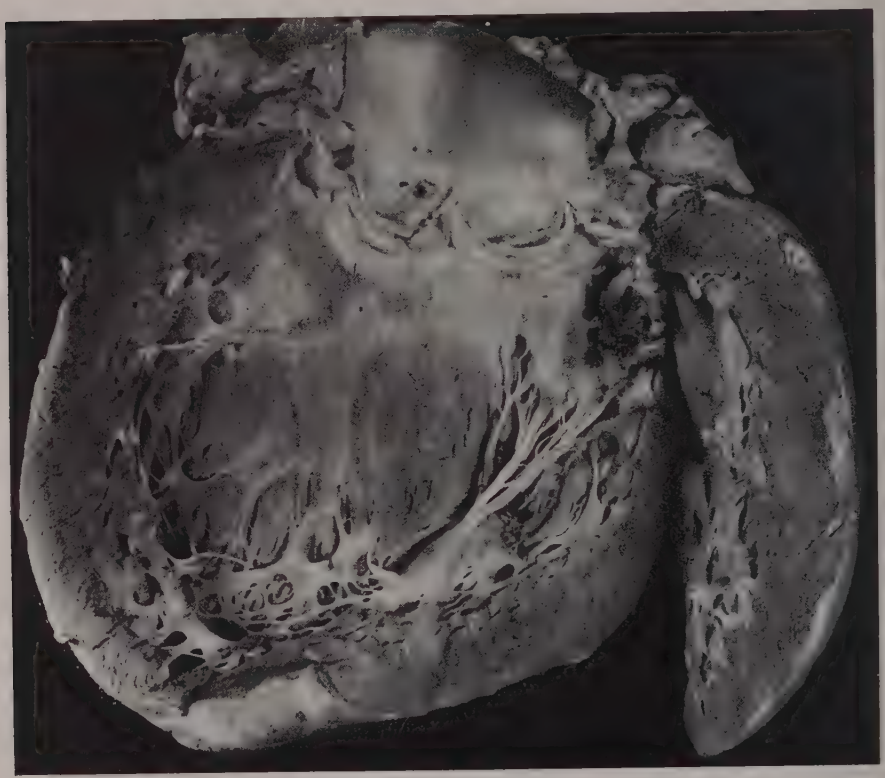


Fig. 33
Obs. 17 — S. J. A. — Endocardite ulcerosa mitral. Endocardite crônica fibrosa aórtica

Fez-se tratamento pela aplicação de sôro antigonocócico e vacinas autogenas por via subcutânea. A 10-9-40 teve hemoptises que se repetiram depois. Exame de escarro negativo para o bacilo de Koch. O falecimento ocorreu a 26-8-40; a autopsia foi praticada 10 horas após a morte pelo Dr. Magarinos Tôrres. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 4.976)

Endocardite maligna, tricuspide, mitral, aórtica e parietal do ventrículo direito. (Figs. 35 e 36).

Abcesso do miocárdio.

Infartos de ambos os pulmões.

Edema e hiperemia passiva dos pulmões.

Esplenomegalia.

Esplenite aguda.

Hiperemia passiva do fígado.

Pionefrite.

Hidroperitôneo.

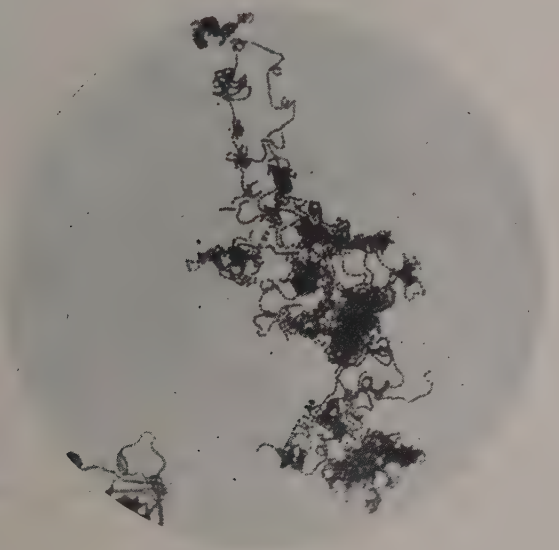


Fig. 34
Obs. 17 — S.J.A. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se cocos grupados em longas cadeias, posteriormente identificados ao *Streptococcus viridans*.

Exames bacteriológicos: Nos esfregaços do sangue do coração, colhido no decorrer da autopsia observamos diplococócs Gram negativos (Fif. 37). A semeadura dêsse material deu em resultado a proliferação da *Neisseria gonorrhoeae*. Nos esfregaços de material colhido das lesões da válvula aórtica observamos a presença de diplocócos Gram negativos intra e extracelulares. Igual resultado para os esfregaços das lesões da válvula pulmonar.

Fig. 35
Obs. 18 — I.M.B. — Endocardite maligna da tricuspide, mitral e aorta e parietal do ventrículo direito do coração.

Nas culturas proliferação da *Neisseria gonorrhoeae*. Cultura de material colhido do baço, por punção: esteril. Nos esfregaços de material colhido do útero : ausência de germes.

19 — Francisco A.S., branco, brasileiro, com 29 anos de idade, solteiro, operário. Internou-se na 2.ª enfermaria do Hospital S. Francisco de Assis, Serviço do Prof. Garfield de Almeida a 11 de outubro de 1941. Temperatura 38,5°.

Faleceu a 4 de novembro de 1941 e foi autopsiado 16 e meia horas após a morte pelos Drs. Eitel Duarte, Jônio Sales e Pimenta de Melo. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 7.173)

Endocardite parietal do ventrículo esquerdo.
Miomalácia córdis.
Dilatação das cavidades cardíacas.
Esplenite aguda.
Edema e hiperemia passiva dos pulmões.
Infarto hemorrágico do pulmão direito.

Hidrotórax duplo.
Hidropericárdio.
Hidroperitôneo.
Infartos anêmicos dos rins.
Periplenite crônica.
Arteroma da aorta.
Anasarca.

Exames bacteriológicos : Do material colhido das lesões do endocárdio, do sangue do coração e do baço e dos pulmões isolou-se, em cultura pura, a *Klebsiella pneumoniae*.

Fig. 36
Obs. 18 — I.M.B. — Mesma peça da figura anterior em outra posição. Endocardite maligna da tricuspide, mitral e aorta e parietal do ventrículo direito do coração.

20 — Manuel F., prêto, brasileiro, com 42 anos de idade, internou-se na 15.ª Enfermaria do Hospital S. Francisco de Assis (Serviço do Dr. Thompson Mota). A doença datava de 24 dias e começara com calefrios, sudorese e febre. Tem tosse e expectoração abundante. O exame de escarro foi negativo para germes álcool acido resistentes. O exame do aparelho respiratório revelou frêmito toraco vocal diminuído à esquerda, no espaço interescápulo vertebral. Massicez do dorso esquerdo na altura do ângulo inferior da omo-

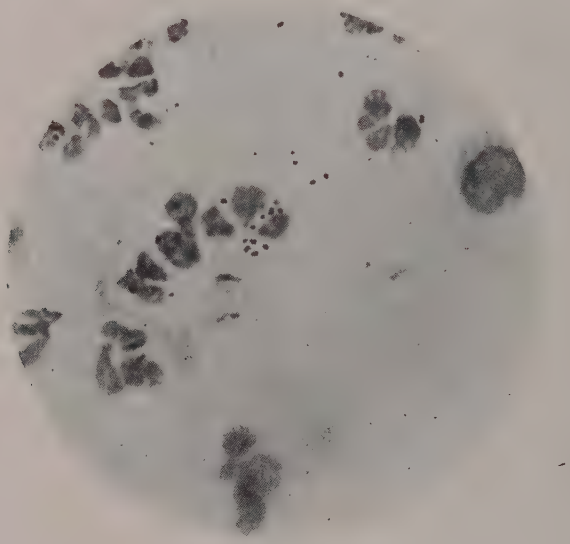


Fig. 37
Obs. 18 — I.M.B. — Esfregaço de material colhido das lesões valvulares. Vêm-se diplococos reniformes intra e extracelulares, posteriormente identificados ao gonococo.

plata. Estertores bolhosos e sibilos na região dos dois ápices. Foi feito o diagnóstico de tuberculose pulmonar, não se tendo examinado o aparelho circulatório. O doente faleceu a 28-3-42, sendo autopsiado 12 horas após a morte pelo Pena de Azevedo. Foi o seguinte o

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA (Protocolo 7.229)

Endocardite ulcerosa e verrucosa aórtica.
Hipertrofia do ventrículo esquerdo. (Fig. 38).
Broncopneumonia.

Abcessos do pulmão.
Pionefrite.
Esplenite aguda.
Edema e hiperemia passiva dos pulmões.
Ascarisdióides.
Pleurite fibrosa crônica adesiva direita.
Tuberculose ulcerosa do ápice do pulmão direito.

Fig. 38
Obs. 20 — M.F. — Trombo endocardite ulcerosa aortica. Trombo endocardite verrucosa aortica.

Exames bacteriológicos: os esfregaços de material obtido do baço, por punção, observamos diplococos Gram positivos (Fig. 39) e o mesmo de material colhido de lesões do endocárdio (Fig. 240). De ambos isolou-se, em cultura pura, o *Diplococcus pneumoniae*.

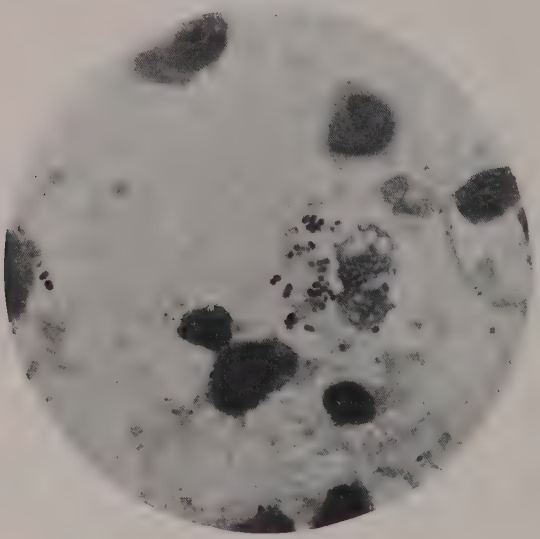


Fig. 39
Obs. 20 — M.F. — Esfregaço de material colhido do baço, por punção. Vêm-se diplococos lanceolados, posteriormente identificados ao pneumococo.

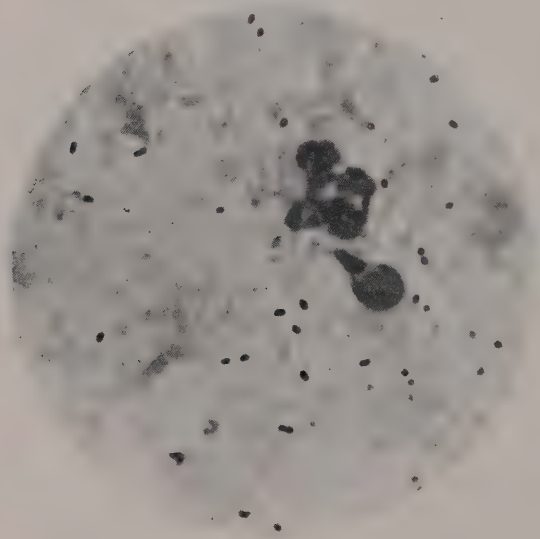


Fig. 40
Obs. 20 — M.F. — Esfregaço de material colhido das lesões do endocardio. Vêm-se diplococos lanceolados com a morfologia típica do pneumococo.

QUADRO CONTENDO OS PRINCIPAIS DADOS DAS OBSERVAÇÕES

N.º DE ORDEM	N.º DA AUTÓPSIA	NOME	SEXO	CÔR	IDADE	TEMPERATURA MÁXIMA	LESÕES ENDOCARDICAS	INFARTOS	GERMES ISOLADOS
1	3.516	Maria C. S.....	f.	branca	27a	39,6.º	Endocardite ulcerosa mitral	baço e rim direito	Pneumococo
2	3 520	Tufi B	m.	branca	25a	40º.	Endocardite ulcerosa mitral, com estensão para o endocardio da aurícula esquerda	baço e rim esquerdo	Estreptococo hemolítico e Estafilococo dourado
3	3.536	Antônio B. C ...	m.	branca	29a	38,6.º	Endocardite ulcerosa e verrucosa aórtica e mitral	baço e rim esquerdo	Pneumococo
4	3.551	Jesué L. P.....	m	preta	43a	37,9º	Endocardite ulcerosa aórtica e mitral	baço e rim direito	Pneumococo
5	3 588	Maria J. C.	f.	parda	53a	38,5.º	Endocardite verrucosa mitral	não	Estafilococo dourado
6	3 591	Antônio D. R.. .	m.	preta	36a	38,3.º	Endocardite parietal do ventrículo esquerdo	não	Pneumococo
7	3 601	Alcides S. ...	m.	preta	17a	39,5.º	Endocardite verrucosa mitral	não	Pneumococo
8	3 629	Oscar S.	m.	parda	29a	39.5.º	Endocardite ulcerosa aórtica	sim esquerdo	Gonococo
9	3.790	João R. M ...	m.	preta	34a	38,7.º	Endocardite ulcerosa aórtica	não	Pneumococo
10	4.622	Maria J. R	f.	branca	32a	39.º	Endocardite crônica e vegetante da valvula pulmonar	pulmões e rins	Pneumococo
11	4.671	Maria T. M	f.	branca	18a	39.5.º	Trombo endocardite ulcerosa aórtica e mitral	baço	Estreptococo (viridans)
12	4.755	Amália S.....	f.	parda	28a	40,5.º	Endocardite ulcerativa e trombose da valvula pulmonar	não	Pneumococo
13	4 787	Julieta R	f.	parda	32a	42,5.º	Endocardite ulcerosa mitral	baço	Esrteptococo hemolítico Estafilococo dourado. Colibacilo.
14	4.789	João E. S.....	m.	parda	44a	38,5.º	Endocardite vegetante aórtica e mitral	baço e rins	Estreptoco (viridans) Estafilococo dourado
15	4 783	Carmelita P. S ..	f.	branca	28a	38,2.º	Trombose do ventrículo esquerdo. Endocardite crônica parietal	cérebro	Pneumococo e colibacilo
16	4 831	Eleonora D ...	f.	branca	40a	39.º	Endocardite verrucosa mitral e aórdica	pulmão direito	Estafilococo dourado, colibacilo
17	4.884	Sebastião J. A.....	m.	branca	27a	38.º	Endocardite ulcerosa mitral. Endocardite crônico fibrosa aórtica	baço e rim esquerdo	Estreptcoco (viridans)
18	4 976	Isaltina M. B ..	f.	branca	29a	37,8.º	Endocardite maligna da tricúspide mitral e aórtica e parietal do ventrículo direito	pulmões	Gonococo
19	7 173	Francisco A. S...	m.	branca	29a	38,5.º	Endocardite ulcerosa parietal do ventriculo esquerdo	pulmão direito e rins	Bacilo de Friedlaender
20	7.229	Manuel F.....	m.	preto	42a	37,9.º	Endocardite aórtica ulcerosa e verrucosa	não	Pneumococo

COMENTÁRIOS

Em quadro anexo reunimos os principais dados referentes às nossas observações que indicaram a grande predominância de germes do grupo dos cocos como agentes causadores das endocardites. Esta observação concorda com a estatística de Perry que, em 1.000 casos, assinalou a presença de esterptococos em 68, 1%, de estafilococos em 10,3%, de pneumococos em 11,2%, de gonococos, em 4,6%, de bacilo de Pfeiffer em 2,6%, de meningococos em 0,9% e, em percentagem inferior, figuram o colibacilo, o bacilo piociânico, a bacterídia carbunculosa e o bacilo de Friedlaender etc.

Fora dos casos de associação observamos, nos nossos, sòmente um ocasionado pela *Klebsiella pneumoniae*. Nos demais encontramos os cocos como agentes causadores principais de acôrdo com a seguinte distribuição:

Pneumococo 10 casos (uma vez associado ao colibacilo).

Estreptococo (*viridans*) 3 casos (uma vez associado ao *Staph. aureus*).

Estreptococo (hemolítico) 2 casos (uma vez associado ao *Staph. aureus* e outra ao colibacilo).

Estafilococo dourado 4 casos (uma vez associado ao Estrp. hemolítico, uma ao Estrp. hemolítico e colibacilo e outra ao colibacilo).

Bacilo de Friedlaender 1 caso

Colibacilo (sempre associado. Uma vez ao Estrp. hemolítico e Estaf. dourado, uma vez ao pneumococo e outra ao Estaf. dourado).

Verifica-se, desde logo, a grande predominância do pneumococo, o que não sucede na estatística de Perry. No entanto, a sua presença nas lesões valvulares nem sempre esteve ligada a processo pulmonar.

Os infartos nos pulmões, rins e baço manifestaram-se em 14 casos (70%).

As hemoculturas praticadas durante a vida nem sempre se mostraram positivas, sendo curioso assinalar a observação n.º 10, caso clínico típico de endocardite lenta e que, apesar disso, as 5 hemoculturas feitas em ocasiões variadas foram negativas. O sangue da doente foi retirado, antes da morte, e conservado o sôro para experiências posteriores, assim como se guardou meio de cultura da mesma partida que dera resultados negativos. Depois de isolado o germe, *post-mortem*, verificamos que o mesmo proliferava perfeitamente bem no meio de cultura que se empregara, assim como em outros, e o sôro da doente não exercia o menor poder impediente sôbre a proliferação do germe isolado. Difícil explicar semelhante ocorrência, a não ser pela passagem intermitente de germes pelo sangue.

A temperatura máxima observada nos doentes variou desde 37,8° C até 42,5° C.

O tempo de duração da doença não poude ser observado com rigor em vários casos. O máximo registrado atingiu a 10 mêses.

Quanto à idade ficaram entre os 25 e 45 anos à exceção de 3 casos (17, 18 e 53 anos). A freqüência da endocardite gonocócica é maior nos indivíduos jovens o que aconteceu nos nossos dois casos. A pneumocócica, pelo contrário, é mais comum nos mais idosos o que as nossas observações contrariaram.

Quanto ao sexo tivemos 12 homens e 8 mulheres. A maior incidência no sexo masculino foi assinalada por Thayer.

Quanto à côr tivemos 8 brancos, 5 pretos e 7 mulatos. As grandes estatísticas dão maior incidência da endocardite gonocócica em pretos. Nos nossos casos ela ocorreu em branco e mulato.

No que se refere aos exames bacteriológicos verificamos, desde logo, a necessidade de serem praticados com rigores técnicos. O simples exame bacterioscópico de material colhido das lesões não assegura o resultado se bem que, em alguns casos, como se poderá ver pelas figuras 2, 6, 9, 11, 15, 21, 23, 25, 34, 37, 39 e 40, o exame das culturas concordou com a observação microscópica direta. Em muitos casos, êste primeiro exame nada elucida.

RESUMO

Expomos e analisamos, no presente trabalho, as principais idéias emitidas acêrca das endocardites sépticas. De grande importância foram as de Schottmueller sôbre o caráter autônomo da endocardite lenta, assim a especificidade do seu agente etiológico. Observações posteriores trouxeram restrições à teoria dêsse autor e as nossas se encontram nesse número, conforme se poderá ver no capítulo anterior. Além do *Streptococcus viridans* muitas outras bactérias têm ocasionado casos clínicos típicos de endocardite lenta ou sub-aguda.

Outro ponto para o qual se têm dirigido os pesquisadores é o que trata da mutação do *Streptococcus haemolyticus* em *Streptococcus viridans*, o primeiro dado como mais freqüente nas endocardites agudas. A tendência dos modernos autores é nesse sentido e nós temos observado, não raro, mutações dessa natureza. Há mesmo autores que admitem uma só espécie de estreptococo não passando de acidentes ocasionados por diferentes fatores físicos, químicos e biológicos as características descritas pelos que admitem várias espécies.

As hemoculturas nem sempre foram positivas nos nossos casos, o que tem acontecido a todos os autores que estudaram o assunto. Em primeiro lugar concordamos que é de grande importância o meio de cultura a empregar, assim como os cuidados técnicos auxiliares. Mesmo assim a percentagem de negatividade é elevada. Nem sempre o sôro possui anticorpos que impeçam a proliferação do germe causador, conforme tivemos ocasião de observar em 1 caso. E' mais razoável aceitar, quando tal ocorre, que o germe circule intermitentemente.

Lesões do endocárdio em conseqüência de doenças anteriores, principalmente o reumatismo articular agudo, facilitam o desenvolver da endocardite séptica. Em elevada percentagem verifica-se essa ocorrência e, em nossos casos, os que forneceram informações seguras, doenças cardíacas anteriores puderam ser apuradas.

Segundo referem alguns autores, o depósito de fibrinas e plaquetas nas lesões antigas, quando novamente atacadas, viria facilitar o desenvolvimento da bactéria que entrou em circulação. As nossas observações microscópicas verificaram a presença dêsses elementos.

Concordando com o que se tem observado os germes do grupo dos cocos predominaram de maneira quase absoluta (95%). Contudo, a verificação do pneumococo em 50% dos casos constitui uma exceção às estatísticas melhor elaboradas.

Antes de finalizar desejamos agradecer ao Diretor e Chefes de Serviço do Hospital S. Francisco de Assis e aos Drs. Magarinos Torres e Pena de Azevedo o grande auxílio que nos prestaram durante a execução deste trabalho; ao Sr. J. Pinto pela execução das fotografias e microfotografias.

SEPTIC ENDOCARDITES

SUMMARY

In the present paper the A. A. reviewed the more fundamental problems in the ethiopathogenic process of bacterial endocardits and report the bacteriological observations done by them in 20 cases of the disecase observed at the Section of Pathological Anatomy and Bacteriology of the Hospital S. Francisco de Assis in charge of the Instituto Oswaldo Cruz.

The A.A. isolated *Pneumococcus* from 10 out the 20 cases, *Gonococcus* from 2, *Staphylococcus* from 2, *Streptococcus* from 5 and Friedlaender bacillus from 1.

The A.A. mainly lay stress on the necessity of the bacteriological examinations being made by a specialist, owing to the difficulties sometimes met with and to the consequences of a detailed examination of the isolated germ.

BIBLIOGRAFIA

Babcok — Ap. Jouve.

Baehr, G.

1912. *Glomerular lesions of subacute bacterial endocarditis.* Am. J. Med. Sc. 144, 327.

Besredka.

1901. *De l'hemolysine streptococcique.* Ann. Inst. Pasteur, 15, 880.

Bier, O.

1936. *Sôbre a questão da conversibilidade dos estreptococos enverdescentes em hemolíticos.* Arch. Inst. Biol. 7, 55.

Billings, F.

1909. *Chronic infectious endocarditis.* Arch. Int. Med. 4, 409.

Bingold, K.

1932. *Ueber eine durch anaërobe Streptokokken verursachte endokarditisform.* Deut. Med. Woch. 58, 1, 443.

Boillaud, J.

1840. *Traité clinique du rhumatisme articulaire.* Paris, Baillière éd.

Carles, J. & Marcland, R.

1916. *Les symptomes et complications cardio-vasculaires des fièves paratyphoides.* Arch. Mal. du Coeur, 9, 93.

Ceresoli, A.

1929. *Mutazione de uno streptococco anemolitico e aviridans in emolitico nell'endocardite maligna a lento decorso.* La Riforma Med. 45, 1.074.

Clawson, B. J.

1924. *An analysis of two hundred and twenty cases of endocarditis.* Arch. Int. Med. 33, 157.

Clawson, B. J| & Bell, E. T.

1926. *A comparison of acute rheumatic and subacute bacterial endocarditis.* Arch. Int. Med. 37, 66.

Epstein, E. Z. & Kugel, M. A.

1929. *The significance of post mortem bacteriological examination.* The J. of Inf. Dis. 44, 327.

Friedman, M. Katz, L. N., Howell, K. Lindner, E. & Mendlowitz, M.

1938. *Experimental endocarditis due to Streptococcus viridans; biologic factors in its development.* Arch. Int. Med., 61. 95.

Grant, R.T., Wood, J.E. & Jones, T. D.

1927-29. *Heart valves irregularities in relation to subacute bacterial endocarditis.* Heart. 14, 247.

von Glahn, W. C. & Pappenheimer, A.M.

1935. *Relationship between rheumatic and subacute bacterial endocarditis.* Arch. Int. Med. 55, 173.

Heiberg, H.

1872. *Ein Fall von Endocarditis ulcerosa puerperalis mit Pilzbidungen im Herzen (Mycosis endocardii).* Virchow's Archiv, 56, 467.

Held, I. & Goldbloom, A.A.

1934. *Acute Streptococcus viridans endocarditis — Report of four cases with autopsy in two.* Arch. Int. Med., 53, 508.

Held, I. W. & Lieberson, A.

1943. *Pathogenesis of subacute bacterial endocarditis.* Am. Heart J., 25, 478.

Jouve, A. X.

1936. *Les endocardites malignes Prolongées.* Masson ed. Paris.

Jurukoff, B.

1931. *Zur Biologie des Streptococcus viridans bei Endocarditis lenta.* Zent. f. Bakt. Abt. I, 120, 392.

Keefer, C. S.

1940. *The pathogenesis of bacterial endocarditis.* Am. Heart J., 19, 352.

Kermongant, Y.

1922. *Variations morphologigues du Streptocoque.* C. R. Soc. Biol. 87, 642.

Kinsella, R. A.

1917. *Bacteriologic studies in subacute streptococcus endocarditis.* Arch. Int. Med. 19, 367.

Klebs — Ap. Jouve.

Kreidler, W. A.

1926. *Bacteriologic studies in endocarditis.* J. of Inf. Dis. 39, 186.

Kuczynski, M. H. & Wolff, E. K.

1920. *Untersuchungen ueber die experimentelle Streptokokkeninfektion der Maus. Ein Beitrag zum problem des Viridanssepsis.* Berl. Klin. Woch. 57, 2, 277.

Lancereaux, E.

1862. *Recherches cliniques et anatomo-pathologiques pour servir a l'histoire de l'endocardite suppurée et de l'endocardite ulcereuse.* C. R. Soc. Biol. 3e. s. 4, 3.

Laubry.

1925. Comentários ao trabalho de Marchal e Jaubert. Bull. Mem. Soc. Hôp. Paris, 49, 500.

Laubry, Ch. & Coffin, M.

1928. *Endocardite infectieuse primitive a pneumocoques terminée par la guérison.* Bull. Mem. Hôp. Paris, 52, 281.

Leary, T.

1932. *Early lesions of rheumatic endocarditis.* Arch. Path., 13, I.

Lehmann, W.

1926. *Klinische und Bakteriologische erfahrungen bei Endocarditis lenta.* Klin: Woch. 5, 2, 1408.

Lemierre, A.

1925. Comentários à comunicação de Marchal & Jaubert, Bull. Mem. Hôp. Paris, 4, 501.

Lesbre, Ph. & Granclaude, Ch.

1926. *Les infections strepto-entérococciques des dents et leurs métastases viscerales. Deux cas d'endocardite maligne dus a des virus dentaire cardiotropes.* La Presse Médicale, 34, 1.157.

Libman, E.

1912. *A study of the endocardial lesions of subacute bacterial endocarditis with particular reference to healing or healed lesions; with clinical notes.* Am. J. of Med. Sc. 144, 313.

Libman, E. & Celler, H. L.

1910. *The etiology of subacute infective endocarditis.* Am. J. of. Med. Sc. 140, 516.

Libman, E. & Friedberg, C. K.

1941. *Subacute bacterial endocarditis.* Oxford Medical Publications, 1941.

Liégeois, M. & Alrot, G.

1932. *Notions récentes sur les endocardites lentes.* Ann. de Méd. 32, 61.

Lima, Carvalho J. P.

1929. *Bacteriologia das endocardites.* Ann. Paul. Med. Cir., 20, 217.

Major, R. H.

1912. *Clinical and bacteriological studies on endocarditis lenta.* Johns Hopkins H. Bull. 23, 326.

Marmorek, A.

1902. *La toxine strepctococcique.* Ann. Inst. Pasteur, 16, 169.

Marmorek, A.

1902. *L'unité des streptocoques pathogènes pour l'homme.* Ann. Inst. Pasteur, 16, 172.

Marchal, G. & Jaubert, A.

1925. *Endocardite maligne à évolution lente. Échec de la thérapeutique par injections intraveineuse de filtrat streptococcique.* Bull. Mem. Soc. Hôp. Paris, 49, 495.

MILLS, C. A., NECHELES, H. & CHU, M-K.

1928. *Relation of clumping and desintegration of platelets to body metabolism.* Chinese J. of Phys., 2, 219.

MORGENROTH, J., BIBERSTEIN, H. & SCHNITZER, R.

1920. *Die Depressionsimmunitat. Studien über Superinfektion mit Streptokokken.* Deut. Med. Woch. 337.

NETTER & MARTHA.

1886. *De l'endocardite végétante-ulcereuse dans les affections des voies biliaires.* Arch. Phys. Norm. et Path. 3e. série, 8, 7.

NETTER, A. & SALANIER, M.

1928. *Endocardite végétante apparue plus de deux ans après une pneumonie et ayant duré plus de six mois. Méningite suppurée a pneumocoques. Embolies. Présence a peu près exclusive de streptocoques dans les végétations. Ces streptocoques résultent sans doute d'une mutation.* Bull. Mem. Soc. Méd. Hôp. Paris. 52, 275.

OTTENBERG, R.

1930. *Differential blood cultures.* J. of the Am. Med. Ass. 94, 1896.

PERRY, C. B.

1936. *Bacterial endocarditis* John Wright and Sons Ltd., Bristol.

ROSENOW, E. C.

1909. *Immunological and experimental studies on pneumococcus and staphylococcus endocarditis.* J. of. Inf. Dis. 6, 244.

ROSENOW, E. C.

1910. *Immunological studies in chronic pneumococcus endocarditis.* J. of Inf. Dis. 7, 429.

ROSENOW, E. C.

1910. *A study of pneumococci from cases of infectious endocarditis.* J. of Inf. Dis. 7, 411.

SCHNITZER, R. & MUNTER, R.

1921. *Ueber Zustandänderungen der Streptokokken im Tierkörper.* Zeit. f. Hyg. 93, 86.

SCHOTTMUELLER, H.

1903. *Die Artunterscheidung der fuer den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar.* 50, 849.

SCHOTTMUELLER, H.

1910. *Endocarditis lenta. Zugleich ein Beitrag zur Arturgterscheindung der pathogenen Streptokokken.* Munch. med. Woch. 617.

SCHOTTMUELLER.

1928. *Ueber das Wesen der endokarditis.* Med. Klin. 24, 1.430.

SIEGMUND, H.

1923. *Untersuchungen ueber immunitaet und Entzuendung.* Verhan. d. deut. path. Ges., 19, 114.

THAYER, W.S.

1926. *Studies on bacterial (infective) endocarditis.* The Johns Hopkins Hosp. Rep. v. 22, f. 1.

TORRES, C. MAGARINOS.

1926. *Contribuição ao estudo da trombose do coração. Sôbre a "endocarditis muralis" (endocardite vegetante parietal), um tipo anatômico de endocardite, ocorrendo, não raramente, no Rio de Janeiro, em doentes com insuficiência cardiaca grave (asistolia).* Brasil Médico, A. 40, 1, p. 70, 83, 101.

DE VECCHI, B.

1931. *The endocarditic process in childhood.* Arch. Path., 12, 49.

DE VECCHI, B.

1932. *L'importanza degli istiociti nello svolgimento dei processi endocarditici sperimentale.* Sperimentale. Arch. di Biol. 86. 1.

WADSWORTH, A.B.

1919. *A study of the endocardial lessions developing during Pneumococcus infection in horses.* J. Med. Res. 39, 279.

WEISS, H. & OTTENBERG, R.

1932. *Relation between bacteria and temperature in subacute bacterial endocarditis.* J. Inf. Dis. 50, 61.

WINGE,

1895. Ap. Martha, A. — *Endocardites aiguës.* Paris.

WILLER, H.

1932-33. *Toxische Endokarditis.* Zent. f. Allg. Path. u. Path. An. 56, 1.

WRIGHT, H.D.

1925. *The bacteriology of subacute infective endocarditis.* J. of Path. and Bact. 28, 541.

WRIGHT, H. D.

1926. *The production of experimental endocarditis with pneumococci and streptococci in immunized animals.* J. Path. and. Bact., 29, 5.

ZDANSKY, E.

1931. *Ueber verglichende Keimzahlbestimmungen im arteriellen und venösen Blute bei Endo carditis lenta.* Zeit. f. d. ges. exp. Med. 76, 571.

Tratamento da Osteomielite por assepsia integral e Penicilina intra-arterial. Sutura primitiva e secundária da ferida. (*)

por

Mauricio Gudin e Aloysio Neiva Filho

CASO DE SUTURA PRIMITIVA

H. D. A. — J. V., 39 anos, casado, pintor, residente em S. Paulo, na capital.

O processo osteomielítico teve início aos 13 anos de idade. Há 27 anos (1917) sofreu a 1.ª intervenção cirúrgica. Daí até 1939 sofreu mais oito intervenções, sem resultado, permanecendo sempre um trajeto fistuloso, dôres ao nível do 1/3 inferior da côxa, artralgia, dificuldade de locomoção, só conseguindo trabalhar irregularmente, apesar de exercer profissão que exige esfôrço mínimo dos membros inferiores, pois é pintor sôbre porcelana.

Desiludido da terapêutica cirúrgica, após tantos anos de sofrimento, dirigiu-se, em desespero de causa, a Manguinhos, Instituto Oswaldo Cruz, onde foi internado a 2 de Abril dêste ano no Hospital Evandro Chagas, para, como último recurso, tentar o tratamento pela penicilina.

Aí tomou 259 injeções de penicilina, por via intramuscular, tendo sido feitas aplicações locais de penicilina pela fístula.

Neste período não conseguiu melhoras. Permaneceram a fístula, as dôres ao nivel da côxa, a artralgia e a dificuldade de locomoção.

À vista dêste último insucesso, resolveu tentar, mais uma vez, a intervenção cirúrgica, sendo-lhe explicado que esta seria executada em condições completamente diversas das anteriores, isto é, por assepsia integral e injeção intra-arterial de Penicilina.

Foi internado no Hospital da Beneficência Portuguêsa a 23-5-1944.

Intervenção a 25-5-44. Operador: Prof. Mauricio Gudin, Auxiliar: Dr. Aloysio Neiva Filho, Anestesista: Dr. Ary de Lima.

Anestesia: Raquianestesia pelo método de Pitkin com spinocaina.

---

* Recebido para publicação a 6 de julho de 1944 e dado à publicação em agôsto de 1944.

Operação: Incisão ao nível do bordo do vasto externo acompanhando a fístula que atinge a linha áspera do femur sôbre sua bifurcação. Cuidadosa curetagem do osso e da fístula com exerése do tecido cicatricial. Feita a aplicação de Penicilina local procedeu-se à sutura primitiva da ferida.

7.º *dia* : — Levantamento do curativo protetor na sala de operações totalmente esterilizada. *Cicatrização pastoriana da ferida*.

CASO DE SUTURA SECUNDÁRIA

E. S., com 14 anos de idade, masculino, solteiro, estudante, brasileiro, residente à rua Guimarães 271-A.

H. D. A.: — A osteomielite teve início em 1937. Foi operado pela 1.ª vez em Março de 37. Foram feitas injeções intra-arteriais de vacina. Daí para cá sofreu mais duas intervenções. Permanecem um trajeto fistuloso, dôres e dificuldade de locomoção.

Tendo notícia da Penicilina procurou o Instituto Oswaldo Cruz onde lhe foram feitos 24 curativos locais com aquele medicamento e durante êste período foi-lhe administrada penicilina intra-muscular sem que adviesse resultado algum. Sofre dôres ao nível do terço médio da côxa esquerda onde se constata o orifício de uma fístula que dá saída à secreção purulenta e que pela exploração conduz ao femur até à linha áspera. Entrou para o Hospital da Beneficência Portuguêsa a 9-5-44.

Intervenção a 10-5-44. Operador Prof. Mauricio Gudin, Auxiliar: — Dr. Aloysio Neiva Filho, Anestesista: Dr. Ary de Lima.

Anestesia : Raquianestesia pelo método de Pitkin com spinocaina.

Operação : Incisão fóra do trajeto fistuloso pela via normal de acesso, ao nível do bordo do vasto externo.

Minuciosa curetagem do fóco. Tamponamento da ferida pela incisão operatória que, em sua metade superior, foi reduzida por 3 pontos. Em seguida, o trajeto fistuloso foi curetado, sendo feita a exerése do tecido cicatricial e deixado aberto, sem mecha.

1.º *Curativo*: — No 7.º dia levantou-se o curativo na sala totalmente esterilizada. Constata-se que a ferida operatória na zôna tamponada não apresenta sinal algum de supuração. Novo tamponamento com penicilina. A zôna da fístula está cicatrizada.

2.° *Curativo* : — No 14.° dia foi aberto na sala totalmente esterilizada. A ferida operatória apresenta-se nas mesmas condições das do curativo anterior. Foi feita então a sutura secundária.

3.° *Curativo* : — No 21.° dia retirados os pontos constata-se *cicatrização pastoriana da ferida*.

Em ambos os casos fez-se a penicilina intra-arterial imediatamente após a operação, repetindo-a de 24 em 24 horas; a intramuscular foi administrada de 6 em 6 horas. As injeções continham 200 unidades Oxford.

CONCLUSÕES

O insucesso operatório no tratamento da osteomielite é devido :

1.° ao fato de tratar-se do tecido ósseo que é, no organismo, aquele que possue a mais fraca reação de defesa.

2.° a que toda e qualquer intervenção cirúrgica, realizada pela técnica operatória comum, acarreta, forçosamente, a contaminação da ferida operatória, que é feita pelo material que, tendo sido esterilizado, já não está mais estéril no momento do ato operatório pela ação direta dos germes patogênicos do ar.

3.° pelo fato de que cada curativo constitui nova contaminação associada àquela já existente.

O sucesso obtido se explica porque :

1.° — A intervenção, com assepsia integral, permite levar a limpêsa mecânica do fóco até um limite máximo. Todavia, não se pode admitir que, só por êste meio mecânico, seja possível conseguir a esterilidade do fóco.

2.° — A ação da penicilina local, intramuscular e intra-arterial (via não usada até a presente data) permitiu, como é de supôr, levar a completo termo a esterilização do fóco.

3.° — A abertura do curativo, em sala totalmente esterilizada, impede a contaminação da ferida sendo que, a experiência já adquirida mostra, de modo iniludível, que *uma ferida esteril, aberta ao ar livre, numa sala de curativos comum, apresenta supuração* após 24 horas, fato sôbre o qual já chamamos a atenção em publicações anteriores.

Trata-se pois de fatos virgens na história da cirurgia, sob o ponto de vista da terapêutica empregada — assepsia integral e injeção intra-arterial de penicilina — e da realização de sutura primária e secundária da ferida.

Êles vão de encontro a tudo quanto estava firmado por uma longa experiência baseada na técnica operatória comum de assepsia fictícia que acarreta, fatalmente, a contaminação da ferida, no momento do ato operatório, e renova essa contaminação, cada vez que se procede a um curativo.

Eis a razão pela qual êsses fatos merecem ser registrados desde já, enquanto prosseguimos nossos estudos sôbre tão importante assunto.

Agradecemos ao Diretor do Instituto Oswaldo Cruz, Dr. Henrique Aragão, assim como aos Drs. Arêa Leão, Alvaro Lobo, Genard Nobrega e Herminio Linhares a preciosa colaboração que nos prestaram.

RESUMO

Os AA. apresentam dois casos de Osteomielite crônica submetidos durante anos a diversos tratamentos, sem resultado. Pela associação da assepsia integral com a Penicilina intra-arterial (via ainda não usada), conseguiram a cura após sutura primitiva num caso e secundária no outro.

Por serem fátos excepcionais acham que devem ficar registrados.

ABSTRACT

The AA. present two cases of insidious osteomielites submetted to various treatment without success. However the association of integral assepsia and Penicillin by via intra-arterial (way not yet used) the cure were obtained, in one with immediate suture, and in the other with suture after some time.

Being these cures exceptionally remarkable, the AA. think that they are worthy mentionning.

Estudos sôbre a anemia produzida em cães por benzoato de estradiol (*)

por

W. O. Cruz, R. Pimenta de Mello e E. M. da Silva

(Com 4 figuras no texto)

A anemia produzida em cães por injeção de substâncias estrogênicas, foi descoberta por Arnold e colaboradores(1), quando no decurso de pesquisas tendentes a verificar possível relação entre o hormônio sexual feminino e as glândulas paratiróides, encontraram, por casualidade, nestes animais submetidos a fortes doses de estrogênicos, o aparecimento de anemia ràpidamente mortal.

O mecanismo desta anemia foi interpretado por ação diréta do hormônio sôbre a medula óssea, diminuindo a formação de plaquetas e hematias e excitando a produção de leucocitos. Alguns casos foram explicados como provocados por hemorragias abundantes, enquanto outros por destruição intra-orgânica da hemoglobina, evidenciada pelo teôr de hemosiderina verificado histològicamente nos orgãos. Tyslowitz (2) não vê nas hemorragias abundantes a causa da anemia porque assinala serem as mesmas, em alguns casos, muito escassas. Bareuther e Schabbel (3) assinalam uma ação exclusiva sôbre a trombogênese na medula óssea, sem se referir em especial sôbre a causa da anemia. Schrade (4) escreve: "A doença experimental se apresenta como uma perturbação na função medular de formação sanguínea; há uma reação mieloide, uma anemia de caracter aplástico e uma diatêse hemorrágica que se segue à trombocitopenia". Tyslowitz e Digemanse (5), verificaram medula óssea hiperplástica na série branca e paralizada quanto à série vermelha; consideram que a anemia aplástica é produzida diretamente pelas substâncias estrogênicas impedindo a produção de sangue.

De nossas observações em 60 cães ficou evidenciado que quando se administra benzoato de estradiol diàriamente em grandes doses (dose total de 0.8 a 4.5 mg. por quilo de corpo) aparecem caracteristicamente os seguintes fenômenos: trombocitopenia, anemia normocrômica, normocitica aguda e acentuada que sobrevem repentinamente após um período preliminar em que

(*) Trabalho da Secção de Hematologia auxiliada por benemerência do dr. Guilherme Guinle.

* Recebido para publicação a 24 de julho de 1944 e dado à publicidade em agôsto de 1944.

as cifras hemáticas permanecem normais ou diminuem ligeiramente (fig. 1). disfunção da medula óssea evidenciada pelo aspecto arregenerativo do sangue em tôdas as fases da anemia, hemorragias no tractus intestinal, lesões hemorrágicas observadas à autopsia, principalmente na mucósa intestinal do jejuno, prostação e morte geralmente entre 1 e 3 semanas. Todos os outros fenômenos

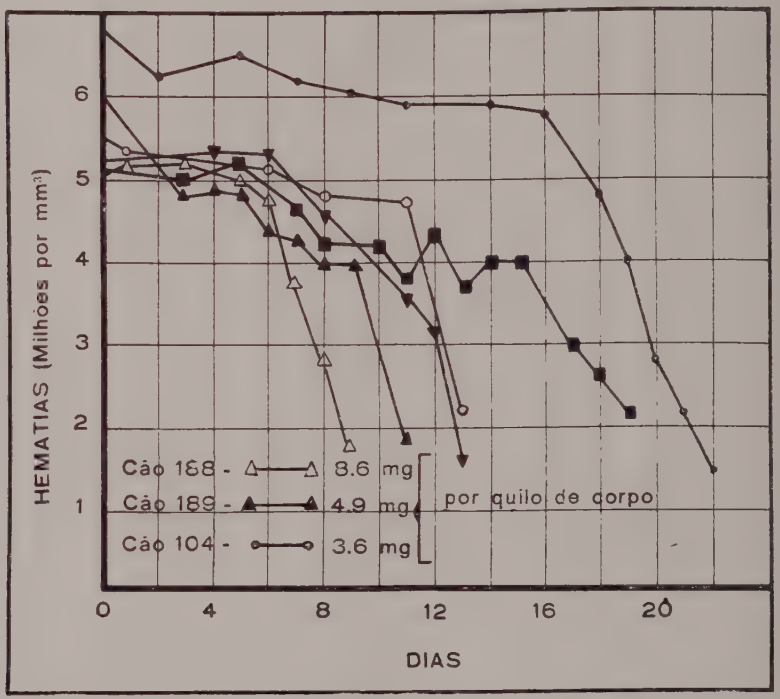


Fig. 1 — *Processo anemiante em cães submetidos à fortes dóses de benzoato de estradiol.*

Cães nos quais foram injetadas sub-cutaneamente dóses variáveis de benzoato de estradiol (1.2 a 8.6 mg por quilo de corpo) dissolvidos em óleos vegetais, apresentando o quadro habitualmente encontrado: a um período de latência em que as cifras hematicas permanecem normais, segue-se uma quéda rápida de hematias, coincidindo com acentuadas hemorragias intestinais. Variações individuais quanto ao tempo necessário ao aparecimento da anemia são bem visíveis nos cães 104, 188 e 189.

descritos na literatura do assunto pódem faltar mais ou menos raramente: lesões purpúricas na pele, petequias nos orgãos internos, leucocitóse elevada, medula óssea de aspecto pioide, parecendo êstes sintômas dependerem do modo de administração, do veículo de dissolução e da variabilidade individual dos cães. Os mais comumente encontrados são as lesões hemorrágicas da pele, pulmão, epicárdio e endocárdio (musculos papilares) (Fig. 1).

O trabalho aqui apresentado, refere-se à experiências realizadas com o fim único de verificar a importância relativa dos seguintes agentes causais da anemia: A) perdas hemáticas por hemorragia; B) destruição hemática intra-orgânica; C) disfunção da medula óssea.

A) — DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA HEMORRAGIA INTESTINAL E DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA TOTAL CIRCULANTE NOS ANIMAIS EM PROVA

Métodos: As determinações do volume total de sangue foram executadas pelo método de coloração do plasma empregando o vermelho vital de acôrdo com a técnica descrita por HEILMEYER (6), usando-se o espectrofotometro de PULFRICH para medida da intensidade da coloração. De acôrdo com o trabalho de SMITH, ARNOLD e WHIPPLE (7) o volume total de hematias calculado na suposição de que o hematocrito do sangue retirado da jugular represente o hematocrito médio do sangue total, dá em 80% dos resultados um valor maior de 28% ± 8% que o encontrado pelo método de perfusão segundo técnica de WELCKER (8). Recentemente HAHN, BALFOUR, ROSS, BALE e WHIPPLE (9) encontraram semelhante resultado empregando o método de determinação de volume de sangue por injeções de hematias contendo ferro radioativo. Baseados nestes trabalhos corrigimos o volume total de hematias diminuindo de 28% o resultado indicado pelo método corante. Como nenhum trabalho neste sentido fôra feito em cães anêmicos, preferimos determinar o segundo volume de sangue, sacrificando o animal por perfusão sanguínea além de prévia determinação pelo método corante. A hemoglobina total, perdida pelos animais foi calculada subtraindo-se da hemoglobina total circulante encontrada pelo método corante (corrigida de menos 28%) a hemoglobina total encontrada no fim da prova pelo método da perfusão mais a hemoglobina retirada diàriamente para as provas hematológicas.

A determinação da quantidade de hemoglobina eliminada nas fézes pelas hemorragias intestinais foi obtida pela técnica de Wú (10), usando da ação peroxidasica da hemoglobina em presença de água oxigenada e benzidina. Uma porção de fézes frescas é pesada e colocada em grál com ácido acético glacial, repetidas vezes até completa extração da hematina. Após centrifugação toma-se um determinado volume do sobrenadante, adicionando 2 cm3. de solução a 0,5% de benzidina em uma parte de ácido acético glacial para 9 partes de álcool absoluto e 4 cm3. de água oxigenada a 0.6 volumes % segundo aconselha BING e BAKER (11). A côr desenvolve-se em 100 minutos sendo a leitura feita no espectrofotometro de PULFRICH. O resultado é obtido

por comparação à uma curva padrão conseguida com resultados provenientes de mistura de fézes a quantidades conhecidas de sangue. Segundo HAUROWITZ (12), o poder peroxidásico da hemoglobina determinado por êste método diminue na passagem pelo intestino pela ação dos sucos digestivos; além disso nas fézes normais existem substâncias de origem vegetal com poder peroxidasico. Considerando êste fato tivemos de padronizar os cães em experiência, eliminando de início por vermífugos repetidos todos os helmintos capazes de produzir pequenas hemorragias e administrando em seguida, por sonda estomacal uma quantidade conhecida de sangue (tabela 1), recuperando nas fézes cerca de 85% da hemoglobina ingerida. O fator da correção encontrado nesta prova ($K = 1.16$) é, em ordem de grandeza, semelhante ao encontrado por HAUROWITZ (12), incubando "in vitro" durante certo tempo na estufa, sangue e sucos digestivos ($K = 1.33$).

TABELA 1

RECUPERAÇÃO DE SANGUE INTRODUZIDO POR SONDA ESTOMACAL

CÃO	DIAS DE PROVA	HEMOGLOBINA INTODUZIDA (g)	HEMOGLOBINA RECUPERADA NAS FEZES (g)	PERCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO	FATOR DE CORREÇÃO
254.....	3	12	10.8	90.0	1.11
257.....	3	22	18.2	82.7	1.21
250.....	3	40	34.3	85.7	1.17
				Média 86.0	Média 1.16

Usamos para esta prova 9 cães (tabela 2) nos quais administramos subcutâneamente benzoato de estradiol na dóse de 0.1 mg. por quilo de corpo, dissolvido em óleo de patauá (óleo muito semelhante ao óleo de oliva). O peso dos animais variou entre 5.2 e 13.5 quilos; a hemoglobina circulante entre 41 e 141 g. As fézes eram colhidas diàriamente e imediatamente dosada a hematina. Quando os cães se apresentavam clìnicamente doentes, com anemia muito acentuada, uma segunda determinação do volume total de sangue era feita pelo método do vermelho vital e o animal sacrificado por sangria a branco seguida de perfusão segundo a técnica de WELCKER (8). O material da luz do intestino era colhido para determinação de hematina. Foram assim obtidas as quantidades de hemoglobina desaparecidas da circulação e a quantidade de hematina e hemoglobina eliminada nas fézes durante todo o período de prova.

A recuperação variou de 30 a 70% da hemoglobina circulante perdida, pela dosagem semi-quantitativa da hematina nas fézes pelo método da ben-

zidina, (Tabela 2). Êste resultado mostra que a anemia se processa em parte pelo extravasamento do sangue pela luz do intestino. Considerando hemorragias observadas nos orgãos e as perdas durante a colheita de fézes nas gaiolas de metabolismo, se poderá afirmar que a hemorragia é fator importante na formação do quadro anêmico.

TABELA 2

cão	PESO (quilos)	DIAS DE EXPERIENCIA	HEMOGLOBINA CIRCULANTE (g)		PERDA DE HEMOGLOBINA CIRCULANTE (g)	HEMOGLOBINA RETIRADA POR SANGRIA (g)	PERDA DE HEMOGLOBINA NA ANEMIA (g)	HEMOGLOBINA RECUPERADA (g)	PERCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO
			* Antes da próva	** Depois da próva					
260....	5.3	20	41	10	31	7	24	12	50
252....	7.6	29	58	20	38	11	27	13	48
257....	8.0	15	66	22	44	7	37	17	46
254....	9.1	15	93	25	68	8	60	22	37
256....	9.7	17	80	18	62	7	55	28	51
251....	10.5	29	80	48	32	11	21	17	81
259....	10.6	15	83	17	66	6	60	17	29
262....	12.2	11	97	25	72	6	66	47	71
258....	13.4	15	122	27	95	7	88	34	39

* Determinada pelo método vermelho vital com correção de menos 28% segundo 80% dos resultados apresentados no trabalho de Smith, Arnold e Whipple.

** Determinada pelo método de perfusão segundo Welcker.

B) — DETERMINAÇÃO DA DESTRUIÇÃO HEMATICA INTRA-ORQÂNICA

Determinação da destruição hematica intra-orgânica foi obtida pelo estudo de três cães nos quais se praticou uma fistula colicisto-renal segundo a técnica de KAPSINOW, ENGLE e HARVEY (18). O cuidado com os cães e o

TABELA 3

ELIMINAÇÃO DE PIGMENTOS BILIARES PELA URINA EM CÃES COM FISTULA COLICISTO-RENAL

cão	SUBSTANCIA INJETADA	ANTES DA PROVA		DEPOIS DA PROVA	
		Dias	Média de bilirubina por dia (mg)	Dias	Média de bilirubina por dia (mg)
163	Benzoato de estradiol (5 mg diário)	10	117	13	63
171	Benzoato de estradiol (1 mg diário)	16	55	12	59
172	Acetilfenilhidrazina (43 mg por quilo de corpo)	7	93	19	371

método para determinação dos pigmentos biliares na urina foi descrito detalhadamente em publicações prévias (14,15).

Como mostra a tabela 3, os cães injetados com benzoato de estradiol excretaram igual ou menor quantidade diária de bilirubina que as observadas no período contrôle. Um terceiro cão foi injetado com acetilfenilhidrazina (43 mg por quilo de corpo), substância que ocasiona grave anemia por

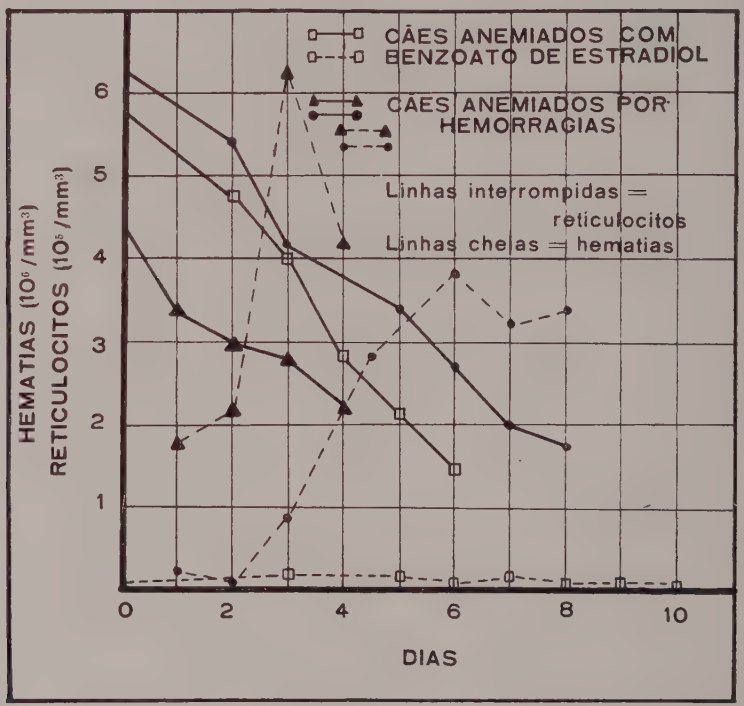


Fig. 2 — *Influência paralizante do benzoato de estradiol sôbre a medula ossea.* Hemorragias praticadas em dois cães (Cães 110 e 113) de tal modo a se produzir queda de hematias comparavel à observada no período crítico da anemia por estradiol, provocaram intensos fenomenos regenerativos (reticulocitôse, representada pelas linhas interrompidas elevadas) em contraste com a aplasia verificada nos cães submetidos a fortes dóses de estrogenico (linha interrompida rastcira).

destruição intra-orgânica, para servir como contrôle dos resultados acima. Êste cão excretou pigmentos em quantidade quatro vezes maior que a do período contrôle.

Em conclusão verifica-se que não há, por êste método, à mais leve destruição intra-orgânica quando se administra grandes dóses de benzoato de estradiol em cães.

c) — DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE DISFUNÇÃO DA MEDULA ÓSSEA

Para determinar o estado de disfunção da medula óssea praticamos duas sortes de experiências.

a) Para determinar se grandes hemorragias na luz do intestino, como se observa em cães com grandes dóses de estradiol, teria efeito paralizador sôbre a capacidade regenerativa da medula óssea.

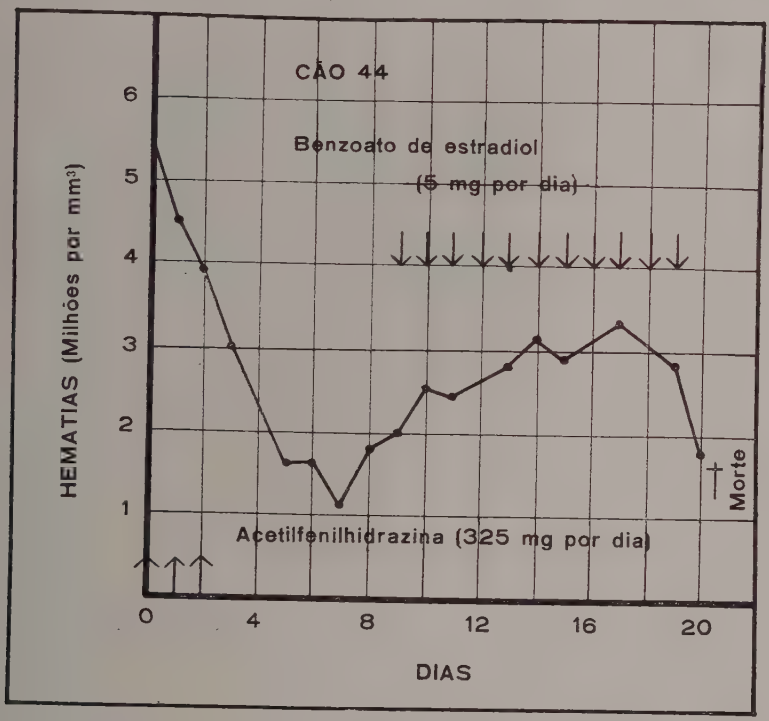


Fig. 3

Sangramos dois cães (Cães 110 e 113) retirando diàriamente uma quantidade tal de sangue, de modo a se processar uma anemia tão rápida quanto aquela provocada com a administração do estrogênico. Em seguida era êste mesmo sangue administrado por sonda estomacal. (Fig. 2).

O exame da figura 2 demonstra uma intensa regeneração nestes animais, evidenciada por alta cifra de reticulocitos, contrastando com o diminuto número de reticulocitos observado nos cães submetidos aos estrogênicos. Ficou

visto por estas experiências não ser a presença de grandes quantidades de sangue no intestino a causa da insuficiência de regeneração na anemia pelo estradiol.

b) Para determinar qual a ação do estradiol durante um período de intensa regeneração hemática provocada por substância destruidora de hematias.

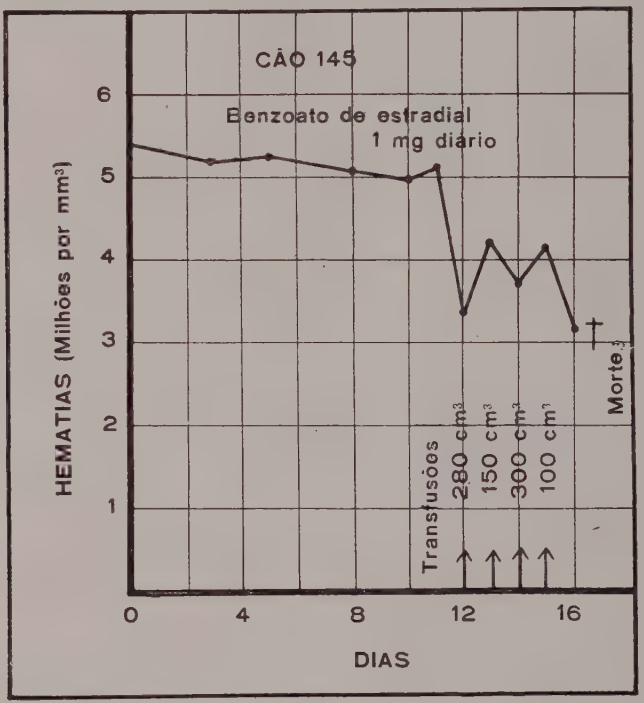


Fig. 4

Injetamos acetilfenilhidrazina (75 mg por quilo do corpo, dividido em três dias) e durante o período regenerativo 5 mg diários de benzoato de estradiol (Figura 3). Êste animal mostrou uma ativa regeneração expressa por um aumento de 2 milhões de hematias por mm3 em 9 dias, até que sobrevieram abundantes hemorragias intestinais, com consequente anemia aguda e morte. A ação do estradiol parece ser a de impedir o início dos processos de regeneração, não tendo apreciável influência durante um período de regeneração já em andamento.

A importância das lesões da mucosa intestinal e consequente hemorragia, é bem vista neste animal, pois o extravasamento de sangue foi de tal violência

que a medula em plena regeneração, não conseguiu impedir a rápida quéda das cifras hemáticas (Figura 3). Que estas lesões intestinais representam uma verdadeira abertura no sistema circulatório, parece mostrar o fato de que repetidas e abundantes transfusões de sangue administradas no período de hemorragias intestinais (Fig. 4, cão 143), não mantem a sobrevida senão por poucos dias.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

A anemia que se processa em cães quando se administra grandes doses de benzoato de estradiol, não parece ser produzida por processos conhecidos de destruição intra-orgânica. Esta substância paraliza os fenômenos de regeneração hemática, parece interferir por processo desconhecido na fisiologia sanguínea, produz graves lesões na rêde circulatória que irriga a mucosa do intestino, principalmente jejuno, ocasionando nesse órgão extravasamento variável de sangue, fator seguramente coadjuvante na formação da anemia.

SUMMARY

The characteristic findings in the pathological picture presented by 60 dogs when administered large doses of estradiol benzoate subcutaneously in an oil vehicle are: thrombocytopenia, aplastic anemia, which follows a brief latent period, intestinal tract haemorrhages, haemorrhagic lesions occurring principally in the mucosa of the jejunum, followed by prostration and death generally within 1 to 3 weeks. Irregular findings are leucocytosis, purpuric skin lesions, visceral haemorrhages and pyoid bone marrow.

The total circulating hemoglobin was determined in 9 dogs before and after the anemia was established, thus verifying the total hemoglobin loss. The blood loss through intestinal haemorrhages during the observation period was determined by benzidine test. The quantity of hemoglobin recovered from the feces in the form of hematin varied between 30 and 70% of the total hemoglobin which disappeared from the circulation.

In order to ascertain the degree of intra-organic blood destruction the bilirubin eliminated in the urine of dogs with gall-bladder renal type of fistula was determined daily and these values compared with those obtained for normal animals. The blood destruction as measured by this method was practically nil.

An attempt was made to determine whether the presence of large quantities of blood in the intestine might exert a paralyzing effect on the regene-

ration of hemoglobin in dogs rendered anemic through haemorrhage. Negative results were obtained. Estradiol benzoate administered to dogs during the period of hematic regeneration which occurs in the recovery stage of anemia produced by acetyl-phenyl hydrazine demonstrated that the estradiol interferes but little when the regenerative processes have already begun.

Repeated transfusions given during the stage of acute anemia practically do not affect the period of survival.

The authors conclude that the main action of estradiol benzoate on the blood physiology of dogs is still obscure. The anemia is not produced by the intra-organic destruction of hemoglobin by known processes and doubtless the blood loss through the intestinal haemarrhages constitutes an important accessory factor in the mechanism of bringing out this anemia.

BIBLIOGRAFIA

1 — Arnold, O., Holz, F. & Marx, H.,
1936. Naturwissenschaften, 24: 314.

2 — Tyslowitz, R.,
1938. Acta Brevia Neerl., 8: 183.

3 — Bareuther, A. & Schabbel, E.,
1937. Klin. Wochr., 16: 1 677.

4 — Schrade, W.,
1938. Fol. Hemat., 61: 145.

5 — Tyslowitz, R. & Digemanse, E.
1941. Endocrinology, 29: 817.

6 — Heilmeyer, L.,
1929. Biochem. Z., 212: 430.

7 — Smith, H. P., Arnold, H. R. & Whipple, G. H.
1921. Am. Jour. Physiol., 56: 336.

8 — Welcker, H.
1854. Vierteljahrschrift f. Praktische Heilkunde, 46: 11.

9 — Hahn, P. F., Balfour, W. M., Ross, J. F., Bale, W. F. & Whipple, G. H.
1941. Science, 93: 87.

10 — Wu, H.
1923. J. Biochem., Japan, 2: 189.

11 — Bing, F. & Baker, R.
1931. Jour. Biol. Chem., 92: 589.

12 — Haurowitz, F.
1931. Archiv fur Verdauunsgskrankheiten, 50: 33.

13 — Kapsinow, R., Engle, L. P. & Harvey, S. C.
1924. Surg. Gynec. & Obst. 39: 62.

14 — Knuti, R. E., Hawkins, W. B. & Whipple, G. H.
1935. J. Exp. Med., 61: 127.

15 — Cruz, W. O., Hawkins, W. B. & Whipple, G. H.
1942. Am. J. M. Sci. 203: 848.

Pesquisas sôbre o Endotrypanum schaudinni Mesnil e Brimont, 1908, parasita do Choloepus didactylus (L) (*)

pelos

Drs. Aristides Marques da Cunha e Julio Muniz

Entre os protozoários hemoparasitas, o *Endotrypanum schaudinni* é sem dúvida um dos mais interessantes e sôbre o qual poucos conhecimentos possuimos até o presente momento ; pois, a não ser os dados referentes à morfologia por êle apresentada no sangue do hospedador vertebrado que é o *Choloepus didactylus* (L.), todas as tentativas de cultivo e de transmissão a outros animais deram sempre resultados negativos, de acôrdo com os trabalhos de vários pesquisadores que estudaram êste parasita. No próprio hospedador vertebrado nenhuma outra fórma além das encontradas no sangue, foi vista em qualquer outro órgão ou tecido, que pudesse ser interpretada como forma evolutiva dêsse protoziário, a não ser as de *Trypanosoma* que Mesnil e Brinont observaram, e que, segundo êles, nenhuma relação apresentava com os parasitos contidos no mesmo material por êles estudado e para os quais propuzeram o nome genérico de *Endotrypanum*.

Em 1936, um de nós (Cunha) em excursão pelo Estado do Pará teve ocasião de observar dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.), pertencentes ao Museu Goeldi, que se achavam parasitados pelo *Endotrypanum*, mas devido a curta permanência em Belém não poude proceder a maiores estudos, principalmente visando a obtenção de culturas. Em 1937 um dos auxiliares da seção de Protozoologia, tendo sido designado para ir em comissão trabalhar no Instituto de Biologia Experimental do Norte, em Belém do Pará, levou a incumbência de proceder a sementeiras em meios de N.N.N., Noguchi e Nöller, do sangue dos exemplares de *Choloepus didactylus* (L.) em cativeiro no museu Goeldi, bem como de outros exemplares que pudessem ser obtidos naquele Estado, sendo dessa incumbência notificado o Dr. Evandro Chagas, que dirigia aquele Instituto. Mais tarde, em 1938, recebíamos daquele nosso malogrado colega, tubos de meio de Nöller que tinham sido semeados com sangue de um exemplar de *Choloepus didac-*

(*) Recebido para publicação a 15 de julho de 1944 e dado à publicidade em agôsto de 1944.

tylus (L.) parasitado com o *Endotrypanum*, tubos êsses que apresentavam um enduto abundante na superfície do meio, constituido por flagelados com características de *Leptomonas*. Mais tarde em 1941, o nosso companheiro de seção, Dr. Emanuel Dias, em excursão pelo Estado do Pará, teve ocasião de semear no meio de Nöller, sangue de um outro exemplar de *Choloepus didactylus* (L.) infetado naturalmente com *Endotrypanum*, e obter novamente cultura abundante de um flagelado com as características de *Leptomonas*, culturas essas que nos foram entregues também para estudo.

O presente trabalho constitui o relato dos estudos que procedemos nesses diversos materiais, obtidos em épocas diferentes e compreende :

1.º — Descrição das formas encontradas no sangue dos dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.), material êsse colhido por um de nós (Cunha) quando em execursão pelo Estado do Pará.

2.º — Estudo das duas amostras obtidas em cultura, com a descrição das formas de desenvolvimento.

3.º — Comportamento das mesmas em relação a certas reações de imunidade.

4.º — Tentativas de infecção de diversos animais, partindo do material das culturas.

5.º — Tentativas de infecção do *Rhodnius prolixus* com material das culturas.

FORMAS ENCONTRADAS NO SANGUE

O nosso estudo se baseia principalmente em esfregaços de sangue corados pelo método de Giemsa, pois o estudo do material a fresco foi dificultado devido o pequeno número de parasitas que os dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.) apresentavam no sangue. Em ambos os materiais, a maioria dos parasitas encontrados se acham como que aderentes às hemátias, e só raros exemplares foram encontrados fora dêsses elementos. A forma por êles assumida geralmente é de uma salchicha, com as extremidades arredondadas ou ligeiramente afiladas, podendo o parasita se apresentar encurvado ou não.

Na maioria dos elementos pode-se observar a presença de um núcleo perfeitamente individualizado, de forma redonda ou ovóide, com cromatina abundante muitas vezes disposta em forma de raios, localizado em muitos exemplares na parte média do corpo e em outros ocupando a extremidade posterior. Aglomerados de grânulos finos corando-se intensamente em ver-

melho e ocupando a região posterior do corpo ou dispostos em tôrno do núcleo, foram frequêntemente observados.

A maioria das formas encontradas apresentam próximo do núcleo um cinetoplasto bem visível, quase sempre em forma de barra, e dele na maioria dos exemplares pode ser visto se originar um flagelo que percorrendo uma das bordas do parasita se transforma muitas vezes em flagelo livre. Essa organela em muitas formas póde ser observada fazendo saliência para fóra da hematia parasitada, enquanto que em outras, após se encurvar, permanece aderente à mesma.

Em grande número de elementos o flagelo livre se mostra bem desenvolvido, atingindo um comprimento equivalente à metade do corpo; em outros êle é representado apenas por um rudimento de flagelo. Formas completamente desprovidas de flagelo livre foram observadas em pequeno número.

Embora os aspectos que acabamos de descrever correspondam aos da maioria dos elementos observados, outros foram encontrados tais como: formas em que o flagelo em vez de percorrer uma das bórdas do corpo do parasita assume uma posição mediana; formas como que desprovidas de flagelo, só com o núcleo e cinetoplasto; formas nas quais o flagelo ao percorrer o corpo do parasita se apresenta com ondulações, dando a impressão da existência de uma membrana ondulante.

Quanto à hemátia parasitada nenhuma alteração foi observada, a não ser quanto à forma, dando a impressão de se acharem distendidas pela presença do parasita.

Em ambos os materiais não encontramos absolutamente elementos com a morfologia de tripanosomas. As medidas apresentadas pelas formas por nós observadas no sangue variavam entre 8 a 12 micra de comp., por 2 a 25 micra de largo.

COMPORTAMENTO NOS MEIOS DE CULTIVO DAS AMOSTRAS ISOLADAS E DESCRIÇÃO DAS FORMAS

As duas amostras isoladas em cultura pura e com as quais trabalhamos apresentam um comportamento idêntico em relação aos meios comumente utilizados na técnica de cultivo dos representantes da família *Trypanosomidae*. No meio de agar glicosado ao qual se junta sangue desfibrinado de coelho ou de cavalo, pH 7,2, o cultivo se apresenta de maneira exuberante, como demonstra o desenvolvimento de um induto espesso, úmido, de côr esbranquiçada na superfície do meio semeado e que se desenvolve no fim de três a quatro dias após o repique. A exuberância da cultura nesse meio só é comparável com a observada nas culturas de certos flagelados de insetos

(*H. culicidarum, H. oncopelti*). No meio semi-sólido de Noguchi o desenvolvimento ocorre na camada mais superficial do meio onde se fórma uma zona intensamente turva no fim de quatro a seis dias.

No meio de N.N.N. o desenvolvimento é muito menos abundante e só ocorre na água de condensação, não se estendendo à superfície do meio acima da camada líquida. A água de condensação não se turva, mesmo após um tempo longo, mas póde-se observar a formação de um depósito pulverulento, não abundante, no fundo da camada líquida. As culturas só se desenvolvem em presença do oxigênio e a temperatura ótima varia entre 25 a 30 graus. À temperatura de 37 graus se mostra prejudicial ao desenvolvimento do cultivo, levando-o ràpidamente á morte.

FORMAS ENCONTRADAS NA CULTURA

Ao exame a fresco, as culturas mais novas (entre 4 e 10 dias) mostram-se constituidas pelos seguintes elementos :

1.º — Formas arredondadas ou em pêra, desprovidas de flagelos livres e por conseguinte imóveis.

2.º — Formas arredondadas ou ligeiramente alongadas, apresentando um esbôço de flagelo livre e pràticamente desprovidas de movimento.

3.º — Formas em pêra, formas em naveta, formas em bastão, tôdas elas apresentando flagelo livre bem desenvolvido, de comprimento igual ou excedendo o comprimento do corpo. Êsses elementos apresentam-se dotados de mobilidade moderada. Amontoados dêsses elementos reunidos pelos flagelas assumindo o aspecto de roseta, são encontrados em grande número nas culturas.

4.º — Formas extremamente finas, com a extremidade posterior terminada em ponta, apresentando um longo flagelo de comprimento equivalente a duas ou três vezes aquele do corpo, e dotadas de movimentos extremamente intensos que lhes permitem se deslocar com extrema ligeireza através o campo microscópico.

A maioria dessas formas que acabamos de descrever, apresenta o protoplasma com numerosos grânulos de aspecto refringente e, em algumas delas, o protoplasma assume o aspecto vacuolizado.

Nas culturas mais novas as fórmas de leptomonas predominam sôbre as formas do tipo leishmania. Nas culturas velhas poucos elementos do tipo leptomonas são encontrados, predominando formas de leishmania e elementos em degeneração. Nas culturas das duas amostras por nós estudadas nunca tivemos ocasião de observar fórmas de critídias.

O estudo das preparações fixadas e coradas (fixação a úmido pelo sublimado álcool de Schaudinn — coloração pelo Heidenhein — diferenciação pela solução de ácido pícrico em álcool a 95.°), feitas com o material das culturas, mostram que não só as formas de leishmanias como as formas de leptômonas podem apresentar dois tipos de estrutura nuclear. O 1.° representado por um núcleo cariosômico, com cario-membrana bem individualizada, junto à qual se dispõe quase sempre finos grânulos de cromatina e um cariosoma bem desenvolvido ocupando a parte central. O 2.° representado por um núcleo compacto constituido por uma grande massa de cromatina bem desenvolvida e em torno da qual não se póde observar uma cariomembrana individualizada. A maioria dos elementos das culturas apresentam o 1.° tipo acima descrito e um menor número o 2.° tipo. Além do núcleo principal, todos os elementos apresentam um cinetoplasto em barra, localizado nas formas de leishmânia junto do núcleo principal e quase sempre disposto lateralmente, e nas formas de leptomonas localizado na metade da porção do corpo compreendida entre o núcleo e a extremidade anterior. Os diversos tipos de evolução entre formas de leishmania e formas de leptomonas são encontrados no material estudado tais como: formas com núcleo principal e cinetoplasto; formas apresentando um rizoplasto; formas com um esbôço de flagelo livre, e finalmente formas típicas de leptomonas. Em relação ao comprimento do flagelo livre, nas formas de leptômonas, podemos observar que em grande número dêsses elementos êle não ultrapassa o comprimento do corpo, ao passo que em menor número de formas êle póde exceder de muito. São justamente estas últimas formas dotadas de um longo flagelo que ao exame a fresco se mostram extremamente móveis, atravessando com grande rapidez o campo microscópico. Formas de divisão foram observadas com frequência nas preparações, e o tipo que predomina é o da divisão binaria, embora tenham sido observadas em pequeno número, formas com 4 flagelos e com o núcleo principal ainda indiviso, bem como elementos com 3 núcleos principais mas com um único aparêlho flagelar dando a impressão da existência de um processo de divisão múltipla ocorrendo ao lado da divisão binária. A divisão nuclear se processa aparentemente por um estiramento do núcleo seguido de estrangulamento, não tendo sido possível a observação de um processo de verdadeira mitose. A divisão nuclear muitas vezes ocorre antes da divisão do cinetoplasto.

Formas de tripanosoma — Nas preparações das culturas por nós estudadas, pudemos observar, embora raramente, a existência de verdeiras formas de tripanosomas, com o cinetoplasto ocupando a extremidade posterior do corpo do parasita, membrana ondulante, flagelo livre fazendo saliência na extremidade anterior do corpo e um núcleo principal que as vezes se dispõe junto do cinetoplasto, outras vezes ocupando a parte central do corpo.

Medidas — Formas de leishmânia : 3 a 4 micra de comp., por 2,5 a 3 micra de largo

Formas de leptômonas:
- comprimento do corpo : 3 a 16 micra.
- largura do corpo : 1 a 3.5 micra
- comprimento do flagelo : 7 a 30 micra

Formas de tripanosomas :
- corpo: 7 a 9 micra de comp., por 1 a 2 micra de largo
- flagelo livre : 3 a 8 micra de comp.

COMPORTAMENTO DAS CULTURAS EM RELAÇÃO A CERTAS REAÇÕES DE IMUNIDADE

Apesar do estudo morfológico das formas encontradas nas culturas por nós estudadas permitir diferenciar o flagelado em questão de todos os demais representantes da família *Trypanosomidae*, parasitos de vertebrados, resolvemos proceder a algumas experiências de imunidade com o fim de estudar as relações imunológicas existentes entre o *Endotrypanum* e os representantes mais afins da família *Trypanosomidae*, tais como os pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Schizotrypanum*.

Relataremos primeiro os resultados obtidos com as reações de aglutinação, para passarmos depois às reações de fixação de complemento. Nas primeiras utilizamos sôros específicos preparados em coelho por inoculação por via venosa de emulsão de culturas, a princípio mortas pelo formol, seguidas de emulsões vivas. A pesquiza de aglutininas foi feita sempre utilizando suspensões vivas em soluto fisiológico das diversas amostras de flagelados com que trabalhamos, pois as suspensões mortas, quer por agentes físicos ou químicos, de acôrdo com as nossas experiências, não se prestaram para êsse estudos. Tôdas essas amostras utilizadas por nós com êsse fim não apresentavam o chamado tipo de aglutinação espontânea, tão frequentemente observada entre êsses flagelados. A leitura dos resultados era procedida sempre após a permanência das misturas por duas horas no banho maria a 37°. Nas reações de fixação de complemento os antígenos por nós utilizados eram constituidos por uma suspensão de cultura em soluto fisiológico feita 24 horas antes de se proceder a reação e conservadas durante êsse tempo na geladeira.

As culturas dos diversos flagelados com que trabalhamos foram obtidas no meio de agar glicosado a 2%, pH 7,2, ao qual se adicionava sangue disfibrinado de coelho ou de cavalo nas seguintes proporções : para sangue de coelho 1:10, para o de cavalo 1:5.

As culturas de *Leishmania* foram obtidas em placas de Petri do tipo alto, e as sementeiras eram feitas pelo sistema de estrias utilizando para isso pincéis. Após a sementeira as placas eram invertidas, ficando a superfície

do meio para baixo, tendo-se o cuidado de colocar uma solução de sublimado na outra parte da placa, a fim de evitar o ressecamento da superfície do meio. Culturas abundantes foram sempre obtidas após cinco a seis dias em temperatura compreendida entre 22 a 25 graus.

As culturas de *Endotrypanum* foram feitas em tubos contendo o meio inclinado. As sementeiras eram realizadas com alça de platina e um abundante induto, devido ao desenvolvimento do flagelado, era obtido no fim de 4 a 5 dias à temperatura do laboratório. Após a feitura da suspensão em soluto fisiológico, procedia-se ao exame microscópico da mesma, a fim de verificar a predominância dos elementos flagelados e sòmente após essa verificação era a suspensão empregada nas reações.

As culturas de *Schizotrypanum* foram feitas em frascos de Erlenmayer, com a capacidade de 125 cc., nos quais se colocavam 50 cc. do meio de cultura e deixado solidificar. Como semente eram utilizadas culturas em N.N.N., com a idade de 10 a 15 dias. A água de condensação dêsse meio, rica em flagelados, era adicionada a 1,5 cc. de uma mistura, 1 para 2 de soluto fisiológico e caldo glicosado a 2%. A suspensão assim obtida era colocada no interior dos frascos de Erlenmeyer, de maneira a cobrir completamente a superfície do meio. Os frascos eram mantidos numa temperatura constante de 29°. Culturas muito ricas dêsse protozoário puderam ser obtidas no fim de 6 a 10 dias, utilizando essa técnica.

Reações de aglutinação — A primeira experiência foi executada utilizando um sôro aglutinante preparado com uma amostra de Leishmania visceral americana (amostra Florisvaldo), recentemente isolada, e uma suspensão da primeira cultura de *Endotrypanum*, por nós estudada, que foi denominada de Endo 1 (amostra recebida do Dr. Evandro Chagas). Como testemunha do poder aglutinante do sôro, empregamos uma emulsão de cultura de uma amostra de Leishmania visceral americana, denominada Cão I. No quadro que segue se acham expostos os resultados.

SORO ANTI FLORISVALDO (LEISHMANIA VISCERAL AMERICANA)
Amostra recentemente isolada
Experiência realisada em 16-7-1938

AMOSTRA	1/60	1/80	1/160	1/320	1/640	2/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960	TEST.
Cão 1 (Leish. visc. americana).	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-
Endotrypanum 1..	—	—	—	—	—	—	—	—	—			

Essa primeira experiência teve por fim excluir a hipótese de ser o flagelado em estudo, idêntico a Leishmania visceral americana, e poder representar o *Choloepus didactylus* (L.) um depositário dêsse parasita no mundo exterior, pois ainda não tínhamos verificado nas culturas, o que foi conseguido mais tarde, a presença de verdadeiras formas de *Trypanosomas*, fato êsse que permitiu excluir desde então, essa hipótese. Pelo quadro acima póde-se ver que um soro aglutinante preparado com uma amostra recentemente isolada de Leishmania visceral americana não aglutina o *Endotrypanum*, mesmo nos títulos mais baixos. Mais tarde tivemos ocasião de repetir novamente a mesma experiência, não só com a amostra de *Endotrypanum* denominada de *Endo* 1 como com a outra amostra isolada pelo Dr. Emanuel Dias e por nós denominada de *Endo* 2. Nessa ocasião utilisamos dois outros soros aglutinantes, um de Leishmania visceral americana, amostra Cão 1, e ontro de *Leishmania brasiliensis*, amostra J. A. Ambas essas amostras na ocasião do preparo do sôro, tinham sido recentemente isoladas e os resultados foram idêntico ao acima referido, conforme se póde ver nos quadros que seguem.

SORO ANTI CÃO 1

(Amostra Leishmania visceral americana recentemente isolada)

Experiência realizada em 22-10-1941

AMOSTRA	1/40	1/80	1/160	1/320 x	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	TEST.
J. A.	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Endo 1	—	—	—	—	—	—	—	—		
Endo 2	—	—	—	—	—	—	—	—		

SORO ANTI J. A.

(Amostra de "Leishmania brasiliensis" recentemente isolada)

Experiência realizada em 15-10-1941

AMOSTRA	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/1560	TEST.
J. A.	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Endo 1	—	—	—	—	—	—	—	—
Endo 2	—	—	—	—		—	—	—

Tendo um de nós (Cunha) verificado, conforme trabalho já publicado, que as amostras de *Leishmania*, mantidas durante longo tempo em cultura nos meios artificiais, sofrem modificações na sua constituição antigênica, de maneira que um soro aglutinante, preparado com uma amostra velha, absor-

vido por uma amostra recentemente isolada, é ainda capaz de aglutinar a amostra velha, procuramos ver se idêntico fato ocorria em relação ás culturas de *Endotrypanum*. Com o *Endotrypanum* 1 que vinha sendo mantido por 3 anos em meios artificiais de cultivo preparamos um soro aglutinante. O soro assim obtido foi absorvido com a amostra de *Endo* 2, que acabava de ser isolada, e verificamos que apesar do soro assim absorvido, não mais aglutinar a amostra do *Endo* 2 que serviu para a absorção, ainda continuava a aglutinar, em título relativamente elevado a amostra *Endo* 1 utilizada no preparo do soro aglutinante conforme pode ser observado no quadro abaixo.

SORO ANTI ENDOTRYPANUM 1
(Amostra mantida durante 3 anos em cultura) absorvido pelo Endotrypanum 2 (amostra recentemente isolada)
Experiência realizada em 30-10-1941

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	TEST.
Endo 1 amostra antiga..	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
Endo 2 amostra recente.	—	—	—	—			

Essa experiência foi repetida várias vezes com idênticos resultados, o que aliás já era esperado, porque o soro preparado com a amostra *Endo* 1, apesar de apresentar um alto teôr de aglutininas para a amostra homóloga, 1/20480, só aglutina a amostra *Endo* 2, no título de 1/320, conforme o quadro abaixo.

SORO ANTI ENDOTRYPANUM 1
(Amostra mantida durante três anos em cultura)
Experiência realizada em 7-7-1944

AMOSTRA	1/40	1/80	1/P-160	1/320	1/640	1/1280	1/2650	1/5120	1/10240	1/20480	TEST.
Endo 1.....	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	—
Endo 2 amostra isol. em 1941	+	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Recentemente, decorridos 3 anos após o isolamento da amostra *Endo* 2, repetimos novamente a prova de aglutinação, utilizando o mesmo soro anti-*Endo* 1 empregado na experiência acima, e verificamos que êle já aglutinava a amostra *Endo* 2, no título de 1/2560 como se pode ver no quadro a seguir.

SORO ANTI ENDOTRYPANUM 1
(Preparado em 1Y4-7-1941)
Experiência realizada em 7-7-44

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	TEST
Endo 2 amostra isolada em 1941	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

O aumento do título aglutinante observado, só pode ser atribuido a uma modificação na constituição antigênica da amostra Endo 2; com aparecimento de antigenos secundários semelhantes aos existentes na amostra Endo 1 há 3 anos passados, isto é, na ocasião do preparo do sôro utilizado nessa experiência.

O comportamento das culturas de *Endotrypanum* em presença dè um soro aglutinante para o *Schizotrypanum cruzi* foi bem diferente do que acabamos de relatar em relação aos sôros aglutinantes para as *Leishmanias*. Nessas experiências, utilizamos um soro aglutinante preparado com uma amostra humana de *Schizotrypanum cruzi*, mantida por passagem em cobaia, e que tinha sido recentemente isolada em cultura (amostra *Elvira* 1943). O soro assim preparado, aglutinou em título relativamente elevado a amostra de *Endo* 1 com que trabalhamos nessa experiência, conforme pode ser visto no quadro que segue.

SORO ANTI SCHIZOTRYPANUM
(Amostra Elvira 1943, recentemente isolada)
Experiência realizada em 15-1-1944

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	TEST.
Endo 1.....	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	—	—	—
Elvira 1943....	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	—

Reações de fixação de complemento — Por meio dêsse tipo de reação, procuramos verificar o comportamento dos antigênos e dos soros específicos, preparados com as amostras por nós estudadas de *Endotrypanum schaudinni*, quando em presença de soros específicos e antígenos, preparados com amostras de *Schizotrypanum cruzi*.

O nosso primeiro ensaio foi feito utilizando um antígeno de *Schizotrypanum cruzi* preparado com uma amostra isolada de *Dasipus* sp., que vem sendo mantida, há longos anos, em nosso laboratório, em meios artificiais de cultura.

Os dois sôros específicos empregados nessa reação, foram o sôro anti *Endotrypanum* 1, e um sôro anti-*Schizotrypanum* amostra S. Paulo ,os quais foram empregados nas seguintes diluições : 1:2, 1:10, 1:20 e 1:40. A quantidade dessas diversas diluições, utilizadas nos tubos de reação foi de 0,2 cc. O antígeno era representado por uma suspensão da cultura em soro fisiológico e preparada 24 horas antes. A dose da suspensão de antigeno empregada, foi de 0,2 cc., tendo sido prèviamente dosado o poder anti-complementar do mesmo em relação ao complemento do dia. Nos tubos testemunhas dos soros foram empregados 0,2 cc. dos soros em natureza. O esquema abaixo mostra os resultados obtidos.

Amostra tatú (Dasipus sp.)

Experiência realizada em 15-8-1943

	Soro anti-*Schizotrypanum cruzi* Amostra S. Paulo					Soro anti-*Endotrypanum* Amostra 1				
Título da diluição dos soros	1/2	1/10	1/20	1/40	Test. do soro	1/2	1/10	1/20	1/40	Test. do soro
	++++	++++	++++	++++	—	++++	+++	++		-

Num outro ensaio procuramos verificar o comportamento do antigeno preparado com as duas amostras de *Endotrypanum* 1 e 2 quando em presença dos soros anti-*Endotrypanum* 1 e anti-*Schizotrypanum cruzi* (Amostra S. Paulo).

O esquema abaixo mostra os resultados obtidos.

Reação de fixação de complemento com antígeno de *Endotrypanum* 1 e 2

Experiência realizada em 15-8-1943

	Soro anti-*Schizotrypanum cruzi* Amostra S. Paulo					Soro anti-*Endotrypanum* Amostra 1				
Título da diluição dos soros	1/2	1/10	1/20	1/40	Tes. do soro	1/2	1/10	1/20	1/40	Test. do soro
	+++	++	—	—	—	++++	++++	++++	++++	—

As duas experiências acima mencionadas, demonstram que os antígenos de *Endotrypanum* e de *Schizotrypanum cruzi* são capazes de fixar o complemento, quando em presença dos soros específicos anti-*Endotrypanum* e anti-*Schizotrypanum*, embora tenham apresentado variações quanto a intensidade de reação.

TENTATIVAS DE TRANSMISSÃO A OUTROS ANIMAIS

Partindo de material proveniente das culturas fizemos várias tentativas para infetar diversos animais tais como: *Bradypus tridactylus, Didelphis azarae, Mus musculus* e *Leptodactylus occellatus*.

As vias por nós utilizadas foram: a subcutânea, a intra-peritonial e a endovenosa, sendo de notar que alguns dêsses animais tinham sido antes esplenectomizados. Apesar de terem sido inoculadas grandes dóses de cultura, tôdas as tentativas para transmitir a infecção a êsses animais foram negativas.

As pesquizas procedidas em córtes de diversos órgãos provenientes dos animais inoculados bem como de fragmentos de tecido correspondentes ao ponto de inoculação (nos casos de inoculação subcutânea), visando o encontro de possíveis formas de evolução do parasita, resultaram sempre negativas. Nesse último material pôde-se observar sòmente formas de parasitas em completa desintegração pelos elementos de defesa.

Essas experiências nos levaram a pensar ser o *Endotrypanum* dotado de grande especificidade para o *Choloepus didactylus* (L.), desde que fosse excluida a possibilidade da perda de virulência das culturas. Infelizmente não nos foi possível resolver êste ponto, por não termos podido obter até o presente momento, exemplares dessa espécie.

TENTATIVAS DE INFECÇÃO DO RHODNIUS PROLIXUS COM O MATERIAL DAS CULTURAS

Partindo de material das culturas fizemos também tentativas com o fim de verificar si as fórmas nelas desenvolvidas seriam capazes de sofrer uma adaptação ou mesmo evoluirem no tubo digestivo do *Rhodnius prolixus*. Para isso alimentamos numerosos exemplares desse hematófago, nos vários estadios de evolução, que provinham de culturas feitas em laboratório e livres de qualquer contaminação por flagelados, com uma mistura de sangue de cobaio e material obtido das culturas de *Endotrypanum* (amostras 1 e 2). No decorrer de dois mêses, procedemos a exames periódicos do conteúdo da última porção do intestino dos exemplares utilisados nas experiências e não podemos constatar a presença de fórmas evolutivas e nem mesmo de uma simples sobrevivencia das fórmas ingeridas.

DISCUSSÃO

A questão primordial a nosso ver, a ser resolvida, era de saber se as formas que desenvolveram nas culturas semeadas com sangue de dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.), representavam formas de evolução do *Endotrypanum schaudinni*. Somos levados a pensar afirmativamente pelas seguintes razões :

1.º — A evolução por nós observada nas culturas afasta-se das apresentadas em idênticas condições pelos representantes dos gêneros *Leishmania*. *Trypanosoma* e *Schizotrypanum*, nos quais estão enquadrados a maioria dos hemoflagelados parasitas de vertebrados, pois só tivemos ocasião de observar fórmas que correspondem aos tipos morfológicos de *leishmania, leptômonas* e *tripanosoma*, com exclusão de formas *critidia*. E' sabido que os representantes do gênero *Leishmania* evoluem nas culturas sob a forma de *leptômonas*, e *leishmania;* os do gênero *Trypanosoma*, quando cultivaveis, sob as formas de *critidia* e *tripanosoma* e os do gênero *Schizotrypanum* sob as formas de *leishmânia, critidia* e *tripanosoma*.

2.º — Excluida a observação de Mesnil e Brimont, nenhum outro hemoflagelado a não ser o *Endotrypanum schaudinni*, foi até agora assinalado parasitando o sangue de *Cholcepus didactylus* (L.), em particular os exemplares oriundos da região amazônica.

Justificando dessa maneira o nosso ponto de vista em relação à questão acima enunciada, achamos, baseados nos estudos das culturas, possuir o *Endotrypanum*, ao lado de outros elementos, características próprias para constituir entre os representantes da família *Trypanosomidae*, um gênero a parte, como propuseram Mesnil e Brimont. As reações de imunidade demonstraram que o parasita em questão apresenta uma maior afinidade antigênica com o *Schizotrypanum cruzi* do que com os representantes do gênero *Leishmania*, embora se mostre dotado de um maior gráu de adaptação ao hospedador vertebrado que aquele protozoário, como demonstram os seguintes fatos : o parasitismo endoglobular, as tentativas influtíferas para transmitir experimentalmente a infecção a outros animais; e o fato de até hoje, não ter sido êle encontrado parasitando na natureza animais de outra espécie, principalmente de espécies afins do *Choloepus didactylus* (L.).

CONCLUSÕES

1.º — As formas de leishmânia, leptômonas e tripanosoma observadas por nós nas duas amostras de cultura aqui estudadas, as quais foram obtidas em épocas diferentes pela sementeira de sangue de dois exemplares de *Cho-*

loepus didactylus (L.), originários da região amazônica e parasitados pelo *Endotrypanum schaudinni*, representam as formas evolutivas dêsse protozoário nos meios artificiais de cultivo.

Êsse tipo de desenvolvimento em culturas não é encontrado entre os representantes dos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Schizotrypanum*, nos quais estão incluidos a maioria dos hemoflagelados parasitas dos vertebrados e constitui mais um elemento, ao lado de outros já conhecidos, para justificar o ponto de vista de Mesnil e Brimont quando propuseram a criação de um novo gênero entre os representantes da família *Trypanosomidae* para êsse protozoário.

2.° — Pelas reações de aglutinação e fixação de complemento verificamos possuir o *Endotrypanum schaudinni* uma maior afinidade antigênica com o *Schizotrypanum cruzi* do que com os parasitas do gênero *Leishmania*. Os fatos de não ter sido até hoje encontrado na natureza nenhum outro animal, mesmo as espécies afins do *Choloepus didactylus* parasitado por êsse protozoário, e terem sido influtíferas tôdas as tentativas de transmissão experimental, levam a pensar ser o *Endotrypanum schaudinni* um protozoário grandemente adaptado ao parasitismo dessa espécie de *Edentata*.

3.° — Foram verificados, em relação as culturas de *Endrotrypanum schaudinni*, os mesmos fatos já assinalados por um de nós (Cunha) em relação as culturas dos parasitas do gênero *Leishmania*, isto é, que a conservação em meios artificiais de cultura, trazem com o decorrer do tempo, uma modificação na constituição antigênica dêsses parasitos pelo aparecimento de antígenos secundários.

CONCLUSIONS

1.° — In the two culture strains, obtained in different occasions, by the amearing of blood from 2 specimens of *Choloepus didactylus* (L.), of the amazonian region and both parasited by *Endotrypanum schaudinni*, we observed forms of leishmania, leptomonas and trypanosoma, which represent evolutive forms of that protozoa in artificial culture media.

The above type of development in cultures was not yet observed in the *Leishmania*, *Trypanosoma* and *Schizotrypanum*, genera including the majority of hemoflagelates of vertebrates, what constitutes an additional element, besides the other known characters, for justifying the point of view of Mesnil and Brimont, when created, for the mentioned parasite, a new genus in the family *Trypanosomidae*.

2.º — By means of reactions of agglutination and fixation of the complement, we verified that *Endotrypanum schaudinni,* has a greater antigenical affinity to *Schizotrypanum cruzi* than of the genus *Leishmania*.

This fact, the absence of any animal infected in nature by *Endotrypanum schaudinni,* the circunstance of having failed all tentatives of experimental transmission of the parasite to closely allied species of *Choloepus didactylus,* lend us to believe that *Endotrypanum Schaudinni* is strictly adapted to the parasitism of that species of *Edentata*.

3.º — The same facts verified by one of us (Cunha) with cultures of parasites of the genus *Leishmania* were also observed with cultures of *Endotrypanum schaudinni,* namely the alteration in the antigenical constitution of parasite by the formation of secondary antigens some time after the cultivation in artificial media.

BIBLIOGRAFIA

Mesnil e Brimont,

1908. Sur un hématozoaire nouveau (*Endotrypanum* n. gen) d'un édenté de Guyane — C. R. Soc. Biol., LXV, 581.

Darling, S. T.,

1914. The *Endotrypanum* of Hoffman's sloth Journ. Med. Res., XXXI, 195.

Labernadie, V. G. F., e Hubac

1923. Sur l'*Endotrypanum schaudinni* de l'unau, edenté de la Guyane (*Choloepus didactylus*), C. R. Soc. Biol., LXXXVIII, 664.

Wenyon, C. M., e Scott, H. H.,

1925. *Endotrypanum schaudinni* in the two-toed sloth. Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg., XIX, 7.

Wenyon. C. M.,

1926. Protozoology.

ESTAMPA 1

Figs. 1, 2, 3 e 4 — Formas endoglobulares encontradas no sangue dos exemplares de *Choloepus didactylus* (L.).

Fig. 5 — Forma de critídia encontrada fora da hemátia, no sangue do *Choloepus didactylus* (L.).

Figs. 6 e 7 — Formas de leishmânias encontradas nas culturas, sendo que a representada na fig. 7 se apresenta em divisão.

Figs. 8 a 18 — Formas de leptômonas encontradas nas culturas.

Fig. 19 — Forma de leptômona em divisão, apresentando 4 flagelos enquanto o núcleo principal permanece indiviso.

Figs. 20 e 21 — Formas de tripanosomas encontradas nas culturas.

As formas representadas nas figuras 1, 2, 3, 19 e 21 foram desenhadas com Ocular 20 e imm. 100 a altura da mesa, de preparações de cultura fixadas pelo álcool e coradas pelo método de Giemsa.

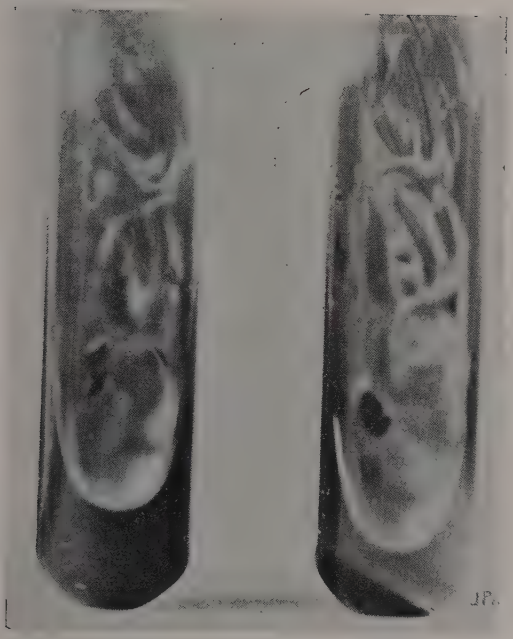
As outras formas representadas nesta estampa, foram desenhadas com Oc. 10 e imm. 100 a altura da mesa, de preparação fixadas a úmido pelo sublimado de Schaudinn, coradas pela hematoxilina de Heidenhein e diferenciadas pela solução de ácido pícrico em álcool a 95.°

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz — Pesquisas sôbre o *Endotrypanum schaudinni.*

ESTAMPA 2

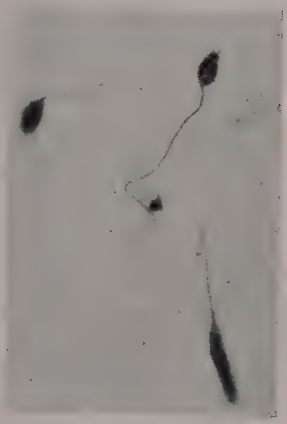
Fig. 1 — Fotografia mostrando o aspeto das culturas do *Endotrypanum schaudinni* no meio de agar-sangue glicosado a 2%.

Figs. 2, 3, 4 e 5 — Microfotografias feitas de preparações fixadas a úmido pelo sublimado de Schaudinn e coradas pela hematoxilina de Heidenhein com diferenciação pela solução de ácido pícrico em álcool a 95°. Nessas microfotografias póde-se ver as formas de *leptômonas* e *leishmanias* que desenvolvem nas culturas de *Endotrypanum schaudinni*.

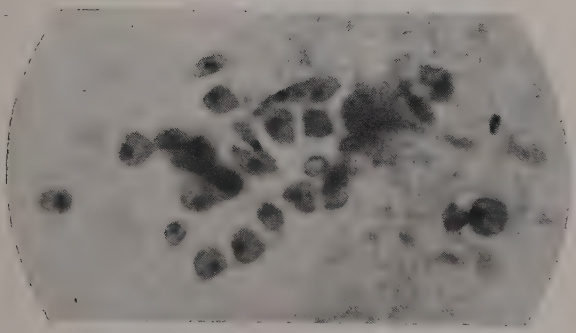


1

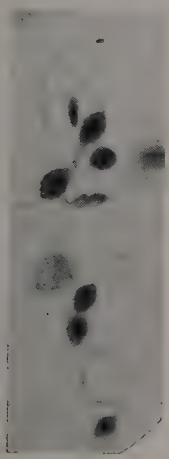
2



3



4



5

Resultados comparativos das reações intra-dermicas com antígenos de bacilos ácido-alcool-resistentes (Leprolinas "Souza-Araujo") e emulsão de lepromas (Lepromina).

(Primeira Nota)

pelo

Dr. Ruy Noronha Miranda

Diretor da Colonia São Roque, Paraná.

Em carta circular datada de 17-9-1943, o prof. Souza-Araujo avisou-nos da remessa para a Colônia São Roque, de 50 ampolas de cinco antígenos de bacilos ácido-álcool-resistentes, preparados em seu Laboratório de Leprologia do Instituto Oswaldo Cruz e feitos de culturas obtidas com a semeadura de material humano leproso ou do sedimento de hematófagos que sugaram doentes de Lepra. O preparo dêsses antígenos, bem como a inocuidade do produto já foram minuciosamente descritos pelo seu autor (1).

Na mesma carta circular, solicitava-nos o dedicado cientista que empregássemos os seus antígenos por via intra-dermica, ao mesmo tempo que a lepromina, observando, assim, comparativamente, os resultados. Tivemos grande prazer e interêsse em por mãos à obra; mas, não o fizemos na medida do nosso desejo, em virtude do grande tempo e energia que nos tomavam as necessidades dos nossos internados. Fizemos as observações solicitadas em um grupo de 20 hanseníanos de diversas formas clínicas e, nesta pequena nota, damos notícia dos resultados conseguidos, com a esperança de podermos prosseguir nos estudos a êsse respeito e esclarecermos a natureza dêstes mesmos resultados, em outros grupos de doentes, um dos quais já em observação. Desta forma procuraremos dar uma pequena contribuição ao grande labor do nosso estudioso patrício.

Os Antígenos. Utilizamos em nossas observações, cinco leprolinas (Leprolinas "Souza-Araujo" de números: 1, 1a, 3, 5, 5a) e o antígeno de emulsão de lepromas, enviado pelo mesmo autor e preparado em Santa Fé pelo Dr. José Mariano.

---

* Recebido para publicação a 24 de julho de 1914 e dado à publicidade em agôsto de 1944.

Doentes utilizados. As intra-dermoreações foram praticadas em 20 internados da Colônia São Roque, todos adultos e com vários anos de doença, sendo 17 homens e três mulheres. As suas formas clínicas eram as seguintes: 13 lepromatosos, em diversos graus, e 7 nervosos puros e tuberculoides.

Técnica seguida. Conforme recomendação de SOUZA-ARAUJO, cada doente recebeu, ao mesmo tempo, injeções intra-dérmicas das cinco leprolinas e e a da lepromina, visto que tal conduta em nada prejudicava a saúde do paciente e os resultados das reações, conforme têm observado os estudiosos desta questão, entre os quais o próprio SOUZA-ARAUJO (2) e SCHUJMAN (3). As injeções foram praticadas na face anterior dos membros superiores (duas em cada braço e uma em cada ante-braço).

Dóse injetada e leitura dos resultados. Em cada inoculação foi empregada a dose de 0,2 cc., tanto do antígeno bacilar como do lepromatoso e as leituras efetuadas, em todos os doentes, às 48 horas, à primeira semana, e às segunda, terceira e quarta semanas. Posteriormente, efetuamos uma última leitura, cerca de dois mezes e meio depois das inoculações, para nos inteirarmos das seqüelas deixadas nos tecidos, pelo processo inflamatório provocado. Os trabalhos foram efetuados em janeiro de 1944.

Semelhante estudo já foi realizado em Minas pelo estudioso colega Dr. JOSÉ MARIANO (4).

RESULTADOS

I — Com a lepromina.

a) Às 48 horas assinalou-se uma pequenina pápula ou ausência de qualquer sinal, em todos os lepromatosos (negativo); enquanto que nos tuberculoides e nervosos, 4 apresentaram pequenina pápula (negativo) e 3, pequenina pápula com halo eritematoso (reação precoce positiva, ou fenômeno de FERNANDEZ).

b) Às leituras semanais, observou-se que, nos lepromatosos, a reação foi negativa (em dois dêles foi duvidosa : pápula persistente até à 4.ª semana); enquanto que, nos nervosos e tuberculoides, a lepromina foi mediana ou fortemente positiva: (nódulo ou ulceração).

Deve-se notar que a intensidade das reações com lepromina caminhava da primeira até à quarta semana, atingindo o máximo nesta última.

II — Com as leprolinas. "Leprolina S.A. 1"

a) Às 48 horas, nos lepromatosos, formou uma pústula em 6, halo eritematoso em 3, e simples pápula em 4; nos nervosos e tuberculoides, em número de 7, formou simples pápula em 6 e halo eritematoso em 1.

b) Às leituras semanais, todos os doentes reagiram às inoculações. Como estamos estudando a maneira por que se dá essa reação dos tecidos cutâneos dos leprosos, às inoculações de leprolinas, verificando se ela difere dos lepromatosos para os tuberculoides e se difere ou semelha a estrutura das reações com lepromina; não avançaremos afirmando que ela tenha sido positiva ou negativa, aquí ou alí. Limitar-nos-emos a descrever as lesões morfológicas que as leprolinas provocaram nos doentes, assim procedendo em relação a todos os antigenos preparados pelo prof. SOUZA-ARAUJO e ora aquí observados.

Em primeiro lugar, notamos que os tecidos reagiram, em todos os casos observados, com mais intensidade nas 1.ª e 2.ª semanas; decrescendo na 3.ª e ficando ausente ou quase desaparecida a reação, ao fim da 4.ª semana. Isto fielmente, tanto para lepromatosos como para tuberculoides e nervosos. Assinalaremos, portanto, as lesões registradas ao fim da 2.ª semana, dizendo que, nos lepromatosos (13 doentes), formou-se um pequeno nódulo em 11, nódulo com eritema circundante em 1, úlceração em 1; nos nervosos e tuberculoides (7 doentes), nódulo em 5 e nódulo-eritema em dois.

"Leprolina S. A. 1a" (obtida de retrocultura de cobaia)

a) Às 48 horas : Lepromatosos: pápula em 11, pápula-eritema em 1 e nenhum sinal em 1. Tuberculoides e nervosos : pápula em 6 e pápula-eritema em 1.

b) 2.ª semana : Lepromatosos: nódulo em 9, nódulo-eritema em 3, úlceração em 1. Tuberculoides e nervosos : nódulo em 4, nódulo-eritema em 2, ulceração em 1.

"Leprolina S.A. 3"

a) Às 48 horas: Lepromatosos: pápula em 12 e nenhuma reação em 1. Tuberculoides : pápula em 5, pápula-eritema em 1, nenhum sinal em 1.

b) 2.ª semana : Lepromatosos: nódulo em 9, nódulo-eritema em 2; ausência de reação, em 2. Tuberculoides e nervosos: nódulo em 6, nódulo-eritema em 1.

"Leprolina S.A. 5"

a) Às 48 horas: Lepromatosos: pápula em 8, pápula-eritema em 1, pústula em 4. Tuberculoides e nervosos: pápula em 4, pápula-eritema em 2. pústula em 1.

b) 2.ª semana : Lepromatosos : nódulo em 11, nódulo-eritema em 1, ulceração em 1. Tuberculoides e nervosos: nódulo em 5, nódulo-eritema em 2.

"Leprolina S. A. 5a"

a) Às 48 horas: Lepromatosos: pápula em 12, pápula-eritema em 1, ausência de lesão em 1. Tuberculoides e nervosos: pápula em 4, pápula-eritema em 2, ausência de reação em 1.

b) 2.ª semana: Lepromatosos: nódulo em 10, ulceração em 2, nódulo-eritema em 1. Tuberculoides e nervosos: nódulo em 6, nódulo eritema em 1.

No que concerne ao estado geral dos pacientes, podemos dizer que as inoculações não causaram qualquer prejuízo às suas saúdes. Assinalaremos os fatos de, no decurso das observações, dois lepromatosos terem apresentado a chamada Reação leprótica, um dos quais acamou; um outro lepromatoso, a partir da segunda semana da inoculação dos antígenos, começou a notar — e nós o notamos, também — a fusão de muitos dos seus tuberculos e lepromas, tornando-se, alguns dêstes hemorrágicos antes de se abrirem para o exterior. Um outro paciente, êste de Lepra nervosa, teve moderada reação geral, no 2.º dia das inoculações, sentindo calafrios e apresentando algumas adenopatias, tudo se acalmando dias depois.

Cerca de dois e meios meses, depois das inoculações, tivemos oportunidade de fazer uma leitura final das reações, em todos os pacientes estudados, notando que no local das inoculações de leprolinas, havia, em muitos deles, uma cicatriz (mesmo naqueles em que não houve ulceração), demonstrando que, na reação, houve destruição de tecidos.

RESUMO E CONCLUSÕES

Em 20 portadores de Lepra, internados na Colônia São Roque, Paraná, 13 dos quais eram da forma lepromatosa e os 7 restantes da forma nervosa pura ou tuberculoide, o autor estudou a reação intradérmica de antigenos bacilares (Leprolinas Souza-Araujo 1, 1a, 3, 5, 5a), comparativamente com as reações produzidas, ao mesmo tempo, com antígeno lepromatoso (Emulsão de lepromas, lepromina).

Observou o seguinte :

1.º — Que a lepromina, comportou-se como habitualmente, isto é, negativa nos lepromatosos e positiva nos nervosos e tuberculoides e *sempre mais intensa* ao fim da quarta semana.

2.º — Que as leprolinas provocam reações, que o autor não conclue serem positivas ou negativas no sentido imunológico da expressão em virtude de estar estudando-as neste sentido, nos lepromatosos e tuberculoides, mas, *sempre*

mais intensas entre a 1.ª e 2.ª semanas, diminuindo de intensidade na 3.ª e desaparecendo ou quase desaparecendo ao fim da quarta semana: nódulos, nódulos-eritema, ulcerações.

3.º — Que nestas reações houve destruição de tecidos, pois a presença tardia de cicatrizes, mesmo quando não houve ulceração, mostra êste fato.

4.º — Que as inoculações das leprolinas, ao mesmo tempo tôdas, ainda acrescidas da inoculação da lepromina, não trouxeram nenhum inconveniente a saúde dos pacientes ; embora um deles tenha apresentado nos primeiros dias, leve reação geral; outro, intensa fusão de suas lesões nodulares de lepra e, dois outros, a chamada Reação leprótica.

Summary and Conclusions

The Author has studied the intradermal reaction on 20 cases of leprosy (13 L and 7 N) by antigens from cultures of acid-fast bacilli, obtained by Souza-Araujo in the Instituto Oswaldo Cruz ("Souza-Araujo's leprolins 1, 1a, 3, 5, 5a") and by the lepromin. The experiments were carried out in the "Hospital Colonial São Roque", at the State of Paraná, Brazil.

He has observed :

1. That lepromin has produced the same classical results: positive in the nervous cases and negative in lepromatous ones.

2. That Souza-Araujo's leprolins produced skin reactions (nodules, nodules-erythema and ulcerations, in the L and N cases, more actives between the first and the second weeks. The A. has done investigations to confirm the immunological value of the reaction by "Souza-Araujo's leprolins".

3. The reactions by antigens from acid-fast bacilli, produced a little skin destruction.

4. The skin inoculations of 5 "Souza-Araujo's leprolins" and lepromin, were done at the same time, without great malaise to the patients. In two lepers have developped the lepra reaction during the experiments ; one, a little fever, another with fusion of the lepromatous lesions in his skin.

BIBLIOGRAFIA

(1) Souza-Araujo, H. C. de,

"Preparo de Antígenos (Leprolinas Souza-Araujo) de culturas de bacilos ácido-álcool-resistentes isolados de leprosos", Mem. do Inst. O. Cruz, Tomo 39, Fasc. 3, Ano 1943, pg. 349.

(2) Souza-Araujo, H. C. de,

"Intradermo-reações em leprosos com antigenos de culturas de bacilos ácido-álcool-resistentes", Mem. do Inst. O. Cruz, Tomo 32, Fasc. 4, Ano 1937, pg. 469.

(3) Schujman, S.,

"Discordancia observada en los enfermos de lepra entre la intradermoreaccion con lepromina (emulsion de lepromas) y antigenos de los supuestos cultivos de lepra", Rev. Arg. de Dermatosif., B. Ayres, 1939 (4.ª parte), 632.

(4) Mariano, José,

"Resultados do emprêgo das leprolinas "Souza-Araujo" comparativamente com o da lepromina", Mem. do Inst. O. Cruz, Tomo 40, Fasc. 1, Ano 1944, 101.

— Mariano, José,

"Resultados do emprêgo das leprolinas "Souza-Araujo" comparativamente com o da lepromina, em hansenianos". Acta Méd., Vol. 11, ns. 10 e 12, 1943, Saparatum.
Rio de Janeiro, 13 de Julho de 1944.

Verificação da infecção de moscas da familia Tachinidae pela Empusa Cohn 1855. Essas moscas, sugando ulceras lepróticas, se infestaram com o bacilo de Hansen.

Pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Com 3 figuras no texto)

Na manhã de 26 de março de 1944, comemorando o 1.º aniversário da infecção experimental de várias espécies de *Psorophora* pelo bacilo de HANSEN, levei dez leprosos da Colônia Santa Fé à margem esquerda do Rio do Peixe (Três Corações), no mesmo local da experiência do ano anterior, com o fim de capturar novas partidas de culicídeos, após haverem sugado tais doentes, o que consegui. Dentre êsses dez hansenianos lepromatosos, que gentilmente se prestaram à experiência, expondo os seus membros às picadas dos hematófagos, havia um homem branco, de 42 anos (Manoel Reis), que tinha uma ulcera leprótica do tamanho duma moeda de 5 francos, ou 200 réis antigos, na face externa da região maleolar esquerda, a qual foi atacada, insistentemente, por moscas. Notei que 4 ou 5 dêstes insétos, que se mostraram extremamente vorazes, sugaram tôda a serosidade da ulcera, deixando-a limpa e com o aspécto de seca, em poucos minutos. A sua captura, em tubos de ensaio, durante êsse repasto, foi coisa facil.

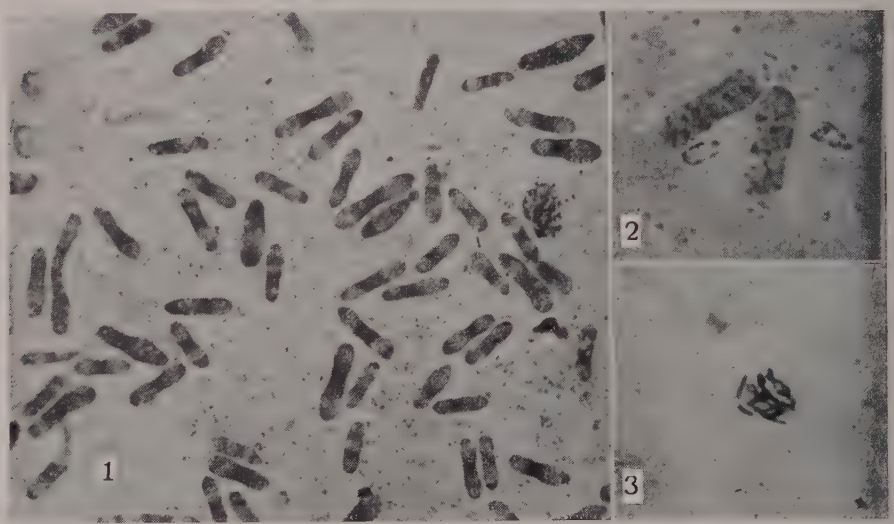
Na manhã seguinte essas moscas estavam tôdas mortas. Mostrei-as ao meu companheiro de excursão Dr. OLIVEIRA CASTRO (entomologista), que as reconheceu como pertencendo à família *Tachinidae*, cuja determinação foi confirmada em Manguinhos pelos meus ilustres colegas Drs. SOUZA LOPES e COSTA LIMA, que não puderam, entretanto, determinar as espécies porque eram em pequeno número os exemplares que submetí ao seu exame. SOUZA LOPES é de opinião que se trata de várias espécies e que o fato que verifiquei, delas sugarem ulceras, é de notável importância.

Os exames microscópicos do conteúdo intestinal de vários exemplares dessas moscas, capturadas em Manoel Reis, feitos por mim no laboratório da Colônia Santa Fé, revelaram bacilos ácido-álcool-resistentes isolados e em pequenos feixes ou massas como se vê na figura 3, e nitidamente corados em azul pelo método de ZIEHL-NEELSEN, os elementos que se veem nas figuras 1 e 2, que outro meu ilustre colega de Manguinhos, o Dr. ARÊA LEÃO (Chefe

* Recebido para publicação a 24 de julho de 1944 e dado à publicidade em agôsto de 1944.

da Secção de Micologia), reconheceu como sendo celulas ferteis e conidioforos dum ficomicêto do gênero *Empusa* Cohn 1855, cuja espécie não poude determinar com os insuficiêntes recursos que lhe fornecí.

Tôdas as moscas dissecadas sôbre laminas, novas e limpas, continham na cavidade abdominal essas celulas ferteis do ficomicêto, porém sòmente uma com a riqueza que se vê na figura 1, indicando intensa infecção.



Figs. 1 e 2 — Empusa Colin 1855. Células ferteis e conidioforos na cavidade abdominal da mosca.

Fig. 3 — Aglomerados de bacilos da lepra.

O Professor Olympio da Fonseca, filho, à página 182 da sua excelente *"Parasitologia Médica"* (Rio, 1943), informa: "Os gêneros *Entomophtora* e *Empusa* incluem parasitos altamente patogênicos de insétos, o último incluindo a bem conhecida *Empusa muscae* que ataca a mosca doméstica matando-a e constituindo em torno dela uma corôa de filamentos de um branco níveo terminados por esporóforos".

Mostrando-lhe eu a microfotografia 1, que ilustra esta nota, o Professor Fonseca me declarou que êsses elementos não lhe pareciam pertencer á *Empusa muscae*.

Merece referir ainda que nos dias subsequêntes, 28, 30 e 31 de março, fiz novas capturas de moscas, após haverem elas sugado a úlcera do Reis. Três dos exemplares capturados no dia 28, e 21 dos capturados a 31, —

êstes últimos tendo sido mortos pelo clorofórmio —, foram tratados pelo método de PETROFF, triturados e o sedimento obtido foi semeado em cerca de 40 tubos de LOEWENSTEIN que, colocados na estufa, em Manguinhos, com grande atraso e por motivo de doença não tendo sido examinados por mim nos prazos convenientes, resultaram em experiência prejudicada.

A meu pedido o Dr. JOSÉ MARIANO, diretor da Colônia Santa Fé, capturou, a 29 de maio, novo lote de moscas num só doente L3, ulcerado, que me mandou no mesmo dia, informando que estava fazendo muito frio e as moscas eram raras. Neste lote SOUZA LOPES encontrou sòmente a espécie *Cochliomyia macellaria* (Fabr., 1775), familia *Calliphoridae*. Eram nove exemplares, três dos quais semeei em LOEWENSTEIN, após desinfecção pela soda cáustica a 10% e trituração e os restantes tentei dissecar sôbre laminas, não o conseguindo por estarem completamente sêcos. No próximo verão pretendo prosseguir nestes estudos, não só para confirmar a infestação de moscas silvestres pelo bacilo de HANSEN, como ocorre normalmente com a mosca doméstica, como também para colecionar material suficiente para a determinação das moscas e a cultura do cogumelo que as parasita.

Por falar em mosca doméstica vale a pena também referir outra observação interessante ocorrida em Santa Fé:

Às 11 horas de 29 de março, no consultório do Hospital da Colônia, enquanto procuravamos infectar seis barbeiros (3 *Triatoma infestans* e 3 *Panstrongylus megistus*) nas orelhas de José Tito (caso L3, de 59 anos de idade), capturei cinco moscas comuns que sugavam, insistentemente, nos lepromas ulcerados que êle tinha nas mãos. Os esfregaços do conteúdo abdominal dessas moscas, examinados no dia seguinte, revelaram abundantes bacilos a.a.r. Não é debalde que se insiste na necessidade dos leprosos trazerem sempre oclusas as suas úlceras, pois, não só pelas patas, como também pelas fezes, a mosca doméstica póde disseminar o bacilo de HANSEN, sugado nelas.

Abstract

The A. refers that, in his last studying trip to Colonia Santa Fé, Minas Gerais State, last month of March (autumn), had captured many wild flies (all from *Tachinidae* family, according to various entomologists of the Instituto Oswaldo Cruz), on a leprotic ulceration of the left leg of a lepromatous case of leprosy. The microscopical examination of the abdominal material from such flies proved the presence, in rather great number, of HANSEN bacilli and a fungus of the genus *Empusa* COHN 1855.

The A. intends to continue, next summer, such interesting research.

Manguinhos, 24 de julho de 1944.

1944
IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — BRASIL